Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Zürich, A. Durig-Wien, P. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolt-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Prag, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Zweiunddreißigster Band.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1911.

RIJKSMUSEUM

QP501
.B58
V. 32

CHEMISTRY LIBRARY

CHEMISTRY LIBRARY

JOURNAL
Does Not Circulate

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, C. Brodig-Zürich, A. Durig-Wien, P. Ehrlich-Breslau, C. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Prag, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Steklasa-Prag, A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, E. v. Tappeiner-München, E. Theis-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Zweiunddreißigster Band.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1911.

RIJKSMUSEUM AMSTERDAM

351298

QP501
.B58
v. 32

INDIANA UNIVERSITY
LIBRARY

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Mayer, Paul. Über Zerstörung von Traubenzucker durch Licht . . 1

Kochmann, Martin und **Ernst Petzsch.** Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde nebst Bemerkungen über den Stoffwechsel der Phosphorsäure und der Magnesia. II. 10

Kochmann, Martin und **Ernst Petzsch.** Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde nebst Bemerkungen über den Stoffwechsel der Phosphorsäure und der Magnesia. III. 27

Löb, Walther. Beiträge zur Frage der Glykolyse. II. 43

Blumenthal, Ferdinand. Biochemische Untersuchungen über aromatische Quecksilberverbindungen. I. 59

Iwanoff, Nicolaus. Die Wirkung der nützlichen und schädlichen Stimulatoren auf die Atmung der lebenden und abgetöteten Pflanzen 74

Jolles, Adolf. Einwirkung von Ammoniak und von Natriumcarbonat auf verschiedene Zuckerarten in verdünnter wässeriger Lösung 97

Scaffidi, Vittorio. Untersuchungen über den Purinstoffwechsel. VI. 101

Sieber, N. Über die Beziehung der Infektion zu Enzymen 108

Grafe, Viktor. Die biochemische Seite der Kohlensäure-Assimilation durch die grüne Pflanze 114

Lachs, Hilary und **H. Friedenthal.** Die Bestimmung des Eisens auf colorimetrischem Wege 130

Kakiuchi, Samuro. Ein Beitrag zur Fettbestimmung im pathologischen Harne 137

Karaülow, Theodor. Über Entgiftung glucosidischer Herzgifte durch Cholesterin in Versuchen am ausgeschnittenen Froschherzen . . 145

Loeb, Jacques [unter Mitwirkung von **Hardolph Wasteneys**]. Die Erhöhung der Giftwirkung von KCl durch niedrige Konzentrationen von NaCl 155

Mancini, Stefano. Über den Restkohlenstoff des menschlichen Blutes unter normalen und pathologischen Verhältnissen 164

Wohlgemuth, J. Bemerkungen zu der Arbeit von B. Slowtzoff: Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern 172

Harden, A. und **W. J. Young.** Über die Zusammensetzung der durch Hefepreßsaft gebildeten Hexosephosphorsäure. I. 173

Young, W. J. Über die Zusammensetzung der durch Hefepreßsaft gebildeten Hexosephosphorsäure. II. 177

Seite

Aron, Hans und Felix Hecsen. Reis als Nahrungsmittel. Untersuchungen über den N- und P_2O_5-Stoffwechsel bei Ernährung mit Reis und anderer hauptsächlich vegetabilischer Nahrung 189

Marchlewski, L. und J. Rebel. Studien in der Chlorophyllgruppe. IX. 204

Glagolew, P. Über die Regeneration von Eiweiß in der Magenschleimhaut 222

Preti, L. Die Muskelarbeit und deren ketogene Wirkung 231

Starkenstein, Emil. Das Verhalten der Uransalze zweibasischer Phosphorsäuren gegen Indicatoren 235

Starkenstein, Emil. Ionenwirkung der Phosphorsäuren 243

Tangl, Franz und Georg v. Hevesy. Zur Methodik der Bestimmung des Kohlenstoffes organischer Substanzen auf nassem Wege . . . 266

Meyer, Kurt. Zur Kenntnis der Bakterienproteasen 274

Meyer, Kurt. Über Anti-Bakterienproteasen 280

Lépine, R. und Boulud. Über den Zucker des Plasmas und der Blutkörperchen 287

Neubauer, E. und O. Porges. Über Nebenniereninsuffizienz bei Phosphorvergiftung 290

Loeb, Jacques (unter Mitwirkung von Hardolph Wasteneys). Über die Entgiftung von Kaliumsalzen durch die Salze von Calcium und anderen Erdalkalimetallen 306

Neuberg, C. und L. Tir. Über zuckerfreie Hefegärungen. II. . . . 323

Marchlewski, L. Über die Dualität der Chlorophyllane 332

Salkowski, E. Kleinere Mitteilungen 335

Bauer, Heinrich. Untersuchungen über Oberflächenspannungsverhältnisse in der Milch und über die Natur der Hüllen der Milchfettkügelchen 362

Blumenthal, Ferdinand und Emanuel Navassart. Über Atoxyl. V. . . . 380

Voorhoeve, N. Beiträge zum Kalkstoffwechsel. II. 394

Doxiades, Leonidas. Beobachtungen über die Maltase des Blutserums und der Leber 410

Bang, Ivar. Untersuchungen über Diastasen. I. 417

Bang, Ivar. Methodologische Notizen 443

Rullmann, W. Die Schardinger-Reaktion der Milch 446

Costantino, A. Beziehungen zwischen höheren Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in verschiedenen Entwicklungsperioden des Organismus. I. 473

Rona, P. Über Esterspaltung in den Geweben 482

Rona, P. und A. Döblin. Beiträge zur Frage der Glykolyse. II. . . 489

Schrauth, Walther und Walter Schoeller. Biochemische Untersuchungen über aromatische Quecksilberverbindungen 509

Higuchi, Shigeji. Bemerkung zu meiner Arbeit: „Ein Beitrag zur chemischen Zusammensetzung der Placenta“ 512

Über Zerstörung von Traubenzucker durch Licht.

Von

Paul Mayer (Karlsbad).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Königl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

(Eingegangen am 19. Februar 1911.)

In einer Reihe von Arbeiten hat C. Neuberg[1]) gezeigt, daß entgegen der bisherigen Annahme fast alle wichtigen, an sich nicht lichtempfindlichen, organischen Substanzen des Tierkörpers sofort beträchtliche Photosensibilität erlangen, wenn sie mit irgendwelchen anorganischen Salzen den verschiedensten Strahlenquellen ausgesetzt sind. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß diese Kombination unter den natürlichen Verhältnissen vielfach gegeben ist und daher biologische Beachtung verdient.

Hinsichtlich des wichtigen Vorganges der Kohlenhydratverbrennung im Organismus schien mir die Frage von Wichtigkeit, ob auch dieser Prozeß einer Beeinflussung durch Lichtstrahlen unter solchen Verhältnissen fähig sei, die sich nicht allzu weit von den natürlichen Bedingungen entfernen. Die gegebene Versuchsanordnung war die, zu untersuchen, ob Lösungen von Zucker, speziell solche von Traubenzucker, bei geringer alkalicarbonat-alkalischer Reaktion durch das Licht eine deutliche Änderung erfahren. Seit den Untersuchungen von Lobry de Bruyn und van Ekenstein[2]) ist es bekannt, daß Glucose, Fructose und Mannose unter dem Einfluß von Hydroxyl-

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 305, 1908; 27, 271. 1910; 28, 355, 1910; 29, 279, 1910.

[2]) Lobry de Bruyn und A. van Ekenstein, Recueil des travaux chim. des Pays-Bas 14, 156, 203, 1895; 16, 262, 1897; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 28, 3078, 1895.

ionen eine Abnahme der optischen Aktivität erfahren, die durch eine wechselseitige, zu einem Gleichgewicht führende Umlagerung der stereoisomeren Zucker zustande kommt. Daneben findet durch stärkere Alkalien auch eine gleichzeitige Zersetzung der Zucker statt, die aus der Kohlenhydratreihe heraus zu einfachen aliphatischen Verbindungen, insbesondere Säuren, führt.

Bei der schwachen von mir angewandten Alkalikonzentration spielt die Eigenwirkung des Alkalis, wie schon hier hervorgehoben sei, nur eine minimale Rolle. Dieser Punkt muß besonders betont werden, da in den letzten Jahren einzelne Autoren dem Alkali für die Zuckerzerstörung unter physiologischen Verhältnissen eine weit übertriebene Bedeutung beigelegt haben. Statt aller Einzelheiten verweise ich auf die Arbeit von Michaelis und Rona[1]), welche die absolute Resistenz des Zuckers gegen eine Hydroxylionenkonzentration, wie sie im Blute vorhanden ist, unzweideutig nachgewiesen haben.

Um den natürlichen Bedingungen am nächsten zu kommen, habe ich Versuche mit Na_2CO_3 angestellt, und zwar in der Weise, daß teils in Quarzgefäßen, teils in gewöhnlichen Glaskolben 1 bis 5%ige Glucoselösungen mit einem von 0,01 bis 0,1% wechselnden Gehalt an Natriumcarbonat in einem Dunkelzimmer den Strahlen einer Heraeus-Quarzlampe ausgesetzt wurden. Teile der Lösungen wurden als selbstverständliche Kontrolle teils im Laboratorium, teils im Brutschrank belassen.

Aus einer großen Reihe von Versuchen, von denen die wichtigsten am Schlusse der Arbeit zusammengestellt sind, hat sich folgendes ergeben. Bei einer Alcalicarbonatkonzentration, die im Brutschrank (37° C) nicht die geringste Wirkung mehr äußert, hat sich bereits ein deutlicher Einfluß der Lichtstrahlen, gemessen an der Drehungsabnahme der Zuckerlösungen, erkennen lassen; und zwar ist diese Beeinflussung bereits nach 2 Stunden sehr ausgesprochen. Es sank nämlich die Drehung einer 0,01% Na_2CO_3 enthaltenden 3%igen Traubenzuckerlösung im Bestrahlungsversuch nach 2 Stunden von 3% auf 2,6%, nach weiteren 5 Stunden auf 2,5%, während im Brutschrank selbst nach 48 Stunden keine Drehungsänderung zu konstatieren war. Steigerte man den Alkalitätsgrad auf 0,05%, so ging

[1]) L. Michaelis und P. Rona, diese Zeitschr. 23, 364, 1910.

die Drehung im Verlaufe von 2 Stunden von 3% auf 1% zurück, um sich auch nach längerer Bestrahlung nicht mehr zu ändern. Dahingegen zeigte die Brutschrankprobe nach 2 Stunden keine Änderung der Polarisation und erst nach 24 Stunden eine Abnahme von 3% auf 2,9%, die auch nach weiteren 24 Stunden nicht weiter sank. In denjenigen Versuchen, in denen der Zuckerlösung 0,1% Na_2CO_3 zugesetzt wurde, war die Lichtwirkung noch ausgeprägter, indem z. B. die Drehung nach 2stündiger Bestrahlung von 3% auf 0,6% zurückging und nach weiteren 5 Stunden auf 0,5%.

Zum Vergleich sei ein Versuch mit Natronlauge angeführt. Und zwar wurde mit Rücksicht auf die vorliegenden Versuche von Jolles[1]) über den Zerfall des Zuckers unter dem Einfluß von NaOH eine von ihm gewählte Konzentration genommen, nämlich eine $^n/_{100}$ alkalische 1%ige Glucoselösung (0,04% NaOH). Bei diesem Versuch nahm die Drehung vor der Quarzlampe nach 4 Stunden um ca. 0,8% ab (von 0,95% auf 0,2%), während in derselben Zeit im Brutschrank die Polarisation von 0,95% nur auf 0,7% sank. Nach 24stündiger Bestrahlung sank die Drehung auf 0, während die im Brutschrank belassene Probe eine Drehung von 0,2% aufwies. (Ein völliges Verschwinden der Drehung, Polarisation = 0, wie Jolles angibt, habe ich hier nicht beobachtet.)

Daß die erheblichen Differenzen zwischen den Brutschrank- und den Bestrahlungsversuchen den Charakter einer katalytischen, d. h. durch Mineralstoffzusatz bedingten Änderung haben, folgt daraus, daß intensive Bestrahlung ohne Alkalizusatz gänzlich wirkungslos bleibt.

Zwei Faktoren sind bei der Beurteilung dieser Ergebnisse zu berücksichtigen: Die Einwirkung der Oxydation und die von der Quarzlampe geäußerte Temperaturwirkung. Bezüglich der ersteren ist folgendes zu bemerken. Zwecks Vermeidung von Verdunstung wurden die Quarz- oder Glaskolben stets verkorkt, so daß es sich, soweit Luftoxydation in Betracht kommt, nur um die geringe im Kolben enthaltene Sauerstoffmenge handeln kann. Was die Temperatur anlangt, so kann, wenn die Kolben der Lampe zu nahe stehen, eine erhebliche Temperatursteigerung

[1]) A. Jolles, diese Zeitschr. 29, 152, 1910.

bis auf 70° durch direkte Erhitzung erfolgen. Durch geeignete Versuchsanordnung kann man diese Temperatureinwirkung ausschließen. Daß die Erhitzung im Vergleich zur Strahlenwirkung nur eine untergeordnete Rolle spielt, zeigen u. a. folgende zwei Experimente:

a) Es wurde eine 3%ige Dextroselösung, die 0,05% Na_2CO_3 enthielt, 2 Stunden lang im Wasserbade bei 80° gehalten. Dabei sank die Drehung von 3% auf 2,9%.

b) In einem mit Spirituslack vollkommen geschwärzten Kolben wurde eine 3%ige, 0,05% Na_2CO_3 enthaltende Traubenzuckerlösung 2 Stunden der Quarzlampe exponiert, und zur Kontrolle die gleiche Lösung in einem gewöhnlichen, durchsichtigen Kolben. Obgleich in dem geschwärzten Kolben die Temperatur höher stieg, so sank die Drehung nur von 3% auf 2,5%, in dem Kontrollkolben jedoch auf 1%.

Die chemischen Vorgänge, die den durch das Licht bewirkten Drehungsabnahmen zugrunde liegen, weichen in mannigfacher Hinsicht von den Prozessen ab, die sich bei reiner Alkaliwirkung auf Zucker abspielen. So kompliziert auch die Einwirkung des Alkalis auf die Zuckerarten verläuft, im großen und ganzen handelt es sich nach den Untersuchungen von Nef[1]), Framm[2]), Buchner, Meisenheimer, Schade[3]) und Jolles[4]) um eine Bildung von Säuren (flüchtige Fettsäuren, Milchsäure, Polyoxysäuren). Die Entstehung solcher sauren Produkte hat sich nun bei der Strahlenwirkung nur in beschränktem Maße nachweisen lassen. Es folgt dies auch daraus, daß die anfangs schwach alkalische Reaktion nur bis zur Neutralität und nur ganz selten bis zur schwach sauren Reaktion umschlug. Lediglich Spuren von Ameisensäure, eventuell auch Buttersäure (s. unten), konnten als einzige saure Produkte nachgewiesen werden. Die intensive Gelbfärbung, die sich schon nach ganz kurzer Zeit unter dem Einfluß der Bestrahlung zu erkennen gab, sowie auch der Geruch, der eigentümlich aromatisch war, deuteten

[1]) Nef, Annal. d. Chem. 376, 1, 1910; Chem. Centralbl. 1910 II, 1370.

[2]) Framm, Arch. f. d. ges. Physiol. 64, 587, 1896.

[3]) Buchner, Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 623. — Buchner, Meisenheimer und Schade, ebenda 39, 4217. — Schade, Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 1 bis 46, 1906.

[4]) A. Jolles, l. c.

von vornherein auf eine Entstehung von aldehydähnlichen Produkten hin (Aldehydharz). Zu ihrem genauen Nachweise wurden die bestrahlten und deutlich veränderten Zuckerlösungen mit Phosphorsäure ganz schwach angesäuert und der Destillation am absteigenden Kühler unterworfen.

Es ist bekannt, daß Zuckerlösungen allein bei der Destillation mit Säure kleine Mengen aldehyd- bzw. ketonartiger Produkte bilden (E. Salkowski, C. Neuberg, L. Borchardt).[1]) Speziell ist dies auch für Phosphorsäure erwiesen (Neuberg und Hildesheimer).[2]) Allein bei der minimalen Phosphorsäuremenge, die zur Übertreibung der Aldehyde angewandt und z. T. durch das in Lösung befindliche Alkalicarbonat noch neutralisiert wurde, war, wie spezielle Versuche zeigten, die Entstehung von Aldehyden und Ketonen ganz verschwindend. Insbesondere gelang es nicht, eine Nitrophenylhydrazin-Verbindung flüchtiger Aldehyde zu isolieren.

Das Destillat wurde so lange aufgefangen, bis noch eine deutliche Reduktion von ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung eintrat. Zur Bindung kleiner Mengen übergegangener flüchtiger Säuren[3]) wurde das Destillat mit $CaCO_3$ geschüttelt und nochmals übergetrieben.

A. Die so erhaltene, von flüchtigen Säuren freie Lösung (aus 500 ccm bestrahlter, 5%iger, 0,1% Na_2CO_3 enthaltender Zuckerlösung) wurde mit 3 g p-Nitrophenylhydrazin (klar gelöst in der erforderlichen Menge 50%iger Essigsäure und etwas Alkohol) versetzt und etwa 1 Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Die Lösung trübte sich alsbald, und beim Erkalten schieden sich gelbe Nadeln ab, die zur Reinigung 2mal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert wurden. Es wurden 2 Fraktionen erhalten, die bei 150° bzw. 206° schmolzen. Die ausgeführten Elementaranalysen zeigten, daß keine einheitlichen Verbindungen vorlagen. Daß die zugrunde liegenden Substanzen

---

[1]) E. Salkowski, Arch. f. d. ges. Physiol. 56, 339, 1894. — C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 123, 1899. — L. Borchardt, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 62, 1906.

[2]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, diese Zeitschr. 28, 525, 1910.

[3]) Wie erwähnt, können nicht flüchtige Säuren (Oxysäuren) kaum entstanden sein, da die Reaktion fast niemals ausgesprochen sauer war, und die vorhandenen Spuren Na_2CO_3 selbstverständlich nur wenig Säure absättigen konnten.

als Aldehyde anzusprechen sind, geht aus ihrem neutralen Charakter, ihrer Flüchtigkeit und ihrem Reduktionsvermögen gegen ammoniakalisch-alkalische Silberlösung hervor.

Im Einklang mit der Bildung solcher Aldehyde steht das Verhalten der bestrahlten Zuckerlösungen bei der Prüfung ihrer Reduktionskraft gegen alkalische Kupferoxydlösung. Sie reduzierten nämlich im Gegensatz zum Ausgangsmaterial z. T. schon in der Kälte oder bei ganz geringem Erwärmen; und die quantitative Titration mit ammoniakalischer Kupferlösung nach Pavy-Kumagawa-Suto-Kinoshita[1]) ergab, daß die Reduktionskraft nicht konform mit dem Drehungsvermögen abgenommen hatte. Berechnet als Zucker zeigte nämlich z. B. eine 3%ige Dextroselösung, deren Drehung von 3% auf 0,9% gesunken war, ein Reduktionsvermögen entsprechend einem Zuckergehalt von 2,4%, und eine 5%ige Zuckerlösung, deren Drehung nach der Bestrahlung bis auf 1,2% abgenommen hatte, ein Reduktionsvermögen entsprechend einem Zuckergehalt von 4,2%. Diese Inkonsequenz kann z. T. selbstverständlich durch einen Übergang in weniger drehende Zucker erklärt werden; z. T. ist aber auch die Entstehung reduzierender, nicht oder schwächer drehender Zuckerabbauprodukte dafür verantwortlich zu machen. Als ein solches ist in Betracht zu ziehen das Glucoson.[2]) Dasselbe reduziert bekanntlich Kupferlösung sehr stark und dreht schwach nach links. Daß tatsächlich Glucoson bei der Bestrahlung entsteht, zeigte die Prüfung mit Phenylhydrazinacetat. Während eine 3%ige Glucoselösung mit essigsaurem Phenylhydrazin beim Stehen in der Kälte innerhalb 24 Stunden nur spärliche Krystalle absetzte, erstarrten die verschiedensten bestrahlten, 0,05 oder 0,1% Na_2CO_3 enthaltenden Zuckerlösungen bereits nach 2 bis 4 Stunden geradezu zu einem Brei verfilzter Glucosazonkrystalle.

B. Zur Gewinnung der an Calciumcarbonat gebundenen flüchtigen Säuren wurde die $CaCO_3$-haltige Flüssigkeit filtriert und auf dem Wasserbad eingeengt. Dabei schieden sich spärliche Krystalle ab, die die Eigenschaften des Calciumformiats

---

[1]) T. Kinoshita, diese Zeitschr. 9, 219, 1908.

[2]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 2631, 1888; 23, 2121, 1890. — E. Fischer und Armstrong, ebenda 35, 3141, 1902.

aufwiesen, z. B. alkalifreie Silbernitratlösung stark reduzierten. Nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure trat der Geruch nach Ameisensäure auf, einige Male jedoch unverkennbar auch nach Buttersäure.

Zusammenfassend kann man sagen, daß unter dem Einfluß des Lichtes (Quarzlampe) eine mit Spuren Soda versetzte Traubenzuckerlösung eine charakteristische Änderung erfährt, die andersartig ist als die, welche durch Soda ohne Bestrahlung bewirkt wird. Es entstehen hierbei neben Spuren flüchtiger Säuren Aldehyde sowie Glucoson. Eine vollkommene Zerlegung des Zuckers in Kohlenoxyd, Kohlensäure, Wasserstoff und Methan, wie sie Berthelot und Gaudechon[1]) bei Bestrahlungsversuchen beschrieben haben, habe ich in meinen Versuchen, die allerdings bei niedrigerer Temperatur vorgenommen wurden, niemals beobachtet. Hinweisen möchte ich jedoch darauf, daß auch, abgesehen von den extremen Bedingungen der französischen Autoren, unter dem Einfluß der ultravioletten Strahlen ein Abbau des Zuckers vor sich geht, der einer eventuellen synthetischen Bildung[2]) analog der Assimilation entgegenwirkt.

Auszug aus den Versuchsprotokollen.[3])

I. 1%ige Glucoselösung ohne Alkalizusatz.			3%ige Glucoselösung ohne Alkalizusatz.	
	Vor der Bestrahlung	Nach 10stünd. Bestrahlung	Vor der Bestrahlung	Nach 10stünd. Bestrahlung
Drehung	0,9%	0,9%	3%	3%

II. 1%ige, 3%ige und 5%ige Glucoselösungen, die 0,02%, 0,05% oder 0,1% Na_2CO_3 enthalten, ändern nach 48stünd. Stehen bei Zimmertemperatur ihre Drehung nicht.

---

[1]) Berthelot und Gaudechon, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc., 1. August 1910 (zitiert nach C. Neuberg und B. Rewald, „Kohlenhydrate", im Biochem. Handlexikon, 1911, S. 323).

[2]) Stoklasa und Zdobnický, diese Zeitschr. 30, 433, 1911.

[3]) Für alle Versuche wurde reinster Traubenzucker (Kahlbaum) verwandt; die Lösungen wurden zwecks Aufhebung der Birotation stets aufgekocht, 24 Stunden stehen gelassen und erst unmittelbar vor der Bestrahlung mit dem Alkalizusatz versehen.

III. 3%ige Glucoselösung. 100 ccm mit 0,01 g Na_2CO_3 versetzt.

	Vor der Bestrahlung	Nach 2std. Bestrahlung	Nach 7std. Bestrahlung	Nach 24std. Aufenthalt im Brutschrank	Nach 48std. Aufenthalt im Brutschrank
Drehung	3%	2,6%	2,5%	3%	3%
Reaktion	schwach alkal.	neutral	neutral	schwach alkal.	schwach alkal.

IV. 3%ige Glucoselösung. 100 ccm mit 0,02 g Na_2CO_3 versetzt.

	Vor der Bestrahlung	Nach 2std. Bestrahlung	Nach 7std. Bestrahlung	Nach 24std. Aufenthalt im Brutschrank
Drehung	3%	2,4%	2,3%	3%
Reaktion	schwach alkal.	neutral	neutral	schwach alkal.

V. 3%ige Glucoselösung. 100 ccm mit 0,05 g Na_2CO_3 versetzt.

	Vor der Bestrahlung	Nach 2std. Bestrahlung	Nach 7std. Bestrahlung	Nach 2std. Stehen im Brutschrank	Nach 24std. Stehen im Brutschrank	Nach 48std. Stehen im Brutschrank
Drehung	3%	1%	1%	3%	2,9%	2,9%
Reaktion	alkal.	neutral	neutral	alkal.	alkal.	alkal.

VI. 3%ige Glucoselösung. 100 ccm mit 0,1 g Na_2CO_3 versetzt.

	Vor der Bestrahlung	Nach 2std. Bestrahlung	Nach 7std. Bestrahlung
Drehung	3%	0,6%	0,5%
Reaktion	alkal.	neutral	neutral

VII. 1%ige Glucoselösung. 500 ccm mit 0,25 g Na_2CO_3 versetzt (0,05%) und im Brutschrank bei 38° belassen.

	Nach 5 Std.	Nach 24 Std.	Nach 48 Std.
Drehung	1%	0,9%	0,9%
Reaktion	alkal.	alkal.	alkal.

VIII. 1%ige Glucoselösung. 200 ccm mit 0,1 g Na_2CO_3 versetzt (0,05%).

	Vor der Bestrahlung	Nach 10std. Bestrahlung
Drehung	1,2%	0,2%
Reaktion	alkal.	schwach sauer

IX. 5%ige Glucoselösung. 500 ccm mit 0,5 g Na_2CO_3 versetzt (0,1%).

	Vor der Bestrahlung	Nach 5std. Bestrahlung	Nach 24std. Bestrahlung
Drehung	5,1%	3,1%	2,9%
Reaktion	alkal.	neutral	neutral

X. 3%ige Glucoselösung. 200 ccm mit 0,2 g Na_2CO_3 versetzt (0,1%).

	Vor der Bestrahlung	Nach 7std. Bestrahlung
Polarisation	3%	0,9%
Titration	3,05%	2,4%
Reaktion	alkal.	neutral

XI. 5%ige Glucoselösung. 300 ccm mit 0,3 g Na_2CO_3 versetzt (0,1%).

	Vor der Bestrahlung	Nach 7std. Bestrahlung
Polarisation	4,9%	1,2%
Titration	5,0%	4,2%
Reaktion	alkal.	schwach sauer

XII. $^n/_{100}$ alkalische 1%ige Glucoselösung (0,04% NaOH enthaltend). Drehung 0,95%.

	Nach 4std. Bestrahlung	Nach 4std. Stehen im Brutschrank	Nach 24std. Bestrahlung	Nach 24std. Stehen im Brutschrank	Nach 48std. Stehen im Brutschrank
Drehung	0,2%	0,7%	0%	0,2%	0,2%
Reaktion	neutral	schwach alkal.	schwach sauer	neutral	neutral

Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde nebst Bemerkungen über den Stoffwechsel der Phosphorsäure und der Magnesia.

II. Mitteilung.

Von

Martin Kochmann und Ernst Petzsch.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 28. Februar 1911.)

In einer vorausgehenden Mitteilung hatte der eine von uns es sehr wahrscheinlich gemacht, daß der Kalkstoffwechsel des erwachsenen Hundes von der Art und Menge der Nahrung in hohem Grade abhängig sei. Es war den Versuchstieren ein sehr kalkreiches gemischtes Futter verabreicht worden, wie es der Sprattsche Hundekuchen darstellt. Da diese Nahrung nicht gleichmäßig zusammengesetzt ist, sowohl was seine anorganischen wie organischen Bestandteile anlangt und der Kalkreichtum der Nahrung ein so hoher sein kann, daß er selbst unter den ungünstigsten Verhältnissen genügend ist, so gingen wir zu neuen Versuchen über, die die Übelstände der früheren vermeiden sollten. Es mußte eine Nahrung verabreicht werden, die an und für sich kalkarm war und bei der der Kalkgehalt durch Zulage eines Kalksalzes willkürlich verändert werden konnte. Außerdem mußte die Nahrung im gewöhnlichen Sinne eine auskömmliche sein und möglichst nur einen der organischen Nahrungskomponenten enthalten, so daß man jederzeit in der Lage war, auch die anderen in bestimmter Menge hinzuzufügen. Da es naturgemäß keine auskömmliche Nahrung gibt, die diese Forderungen restlos erfüllen würde, so wählten wir als Futter für diese Versuche Pferdefleisch, das bis zu einem gewissen Grade unseren Ansprüchen genügte.

Das von Fett sorgsam gesäuberte Pferdefleisch ist arm an Kalk, wie unsere Analysen ergeben, enthält außerordentlich geringe Mengen von Kohlenhydraten (Glykogen) und Fett. Außerdem wird es längere Zeit von den Hunden gern genommen und gut vertragen und gibt zu krankhaften Störungen erst bei längerer Fütterung Anlaß, s. Pflüger[1]), Kochmann[2]).

Wir bereiteten uns die Nahrung für längere Zeit vor, indem wir immer 30 bis 40 kg auf einmal einkauften, von Sehnen und Fett befreiten und dann zu Hackfleisch verarbeiteten. Das feinzerteilte Fleisch wurde in Portionen zu je 750 g abgeteilt und in Blechkonservenbüchsen gefüllt. Diese wurden in strömendem Wasserdampf ungefähr 4 Stunden lang erhitzt, denn so lange dauerte es, bis das Fleisch auch im Innern gar gekocht war und in der Folgezeit bei längerer Aufbewahrung sich unverändert hielt.

Im ersten Teil des ersten Versuches gingen wir allerdings anders vor. Wir trockneten nämlich das Fleisch auf dem Wasserbade und zerrieben es dann in einem Porzellanmörser zu einem homogenen staubförmigen Pulver, das mit Wasser angerührt von den Hunden gern gefressen wurde. Wir verließen aber diese Zubereitung, da sich die eben geschilderte als bequemer erwies.

Der Plan, nach dem wir im ersten Versuch vorgehen wollten und den wir während der ganzen Versuchszeit auch durchführen konnten, war folgender: Der Kalk-, Magnesia-, Phosphorsäure- und Stickstoffwechsel sollten in ihrer Abhängigkeit voneinander und der Kalkstoffwechsel in seinem Verhältnis zu den organischen Nahrungskomponenten in der Weise untersucht werden, daß zunächst eine im Verhältnis zum Körpergewicht des Hundes unzureichende Pferdefleischmenge als Nahrung gegeben wurde. Dann sollte die Fleischmenge allmählich gesteigert werden, bis der Hund in Stickstoffgleichgewicht kam und sogar Stickstoff retinierte. Wenn nun, was nach den früheren Versuchen zu erwarten stand, Kalkverluste eintreten würden, wollten wir versuchen, durch Zulage eines Kalksalzes zur Nahrung das Tier ins Kalkgleichgewicht zu bekommen. Es mußte dann weiter die Frage geprüft werden, ob nunmehr durch weitere Steigerung der Fleischkost und durch Zulage von Fett der Kalkumsatz wieder ungünstig beeinflußt werden konnte. Trat dieser Fall ein, so sollte durch eine Vermehrung der Kalkzulage zum Futter aufs neue Kalkgleichgewicht erzielt werden.

[1]) E. Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol. 80, 1900.

[2]) M. Kochmann, Arch. f. d. ges. Physiol. 94, 593, 1903.

Tabelle I.

Zusammensetzung der Nahrung	N-Gehalt %	P_2O_5-Gehalt %	CaO-Gehalt %	MgO-Gehalt %
Fleischpulver . . .	11,3470	1,7498	0,0292	0,1467
Konservenfleisch .	3,2452	0,4894	0,0071	0,0473

Tabelle II.

Hund, männlich, Körpergewicht am 28. I. 10 10,970 kg, bekam seit dem 29. I. 10 80 g Fleichpulver + 300 ccm H_2O.

Nr. d. Periode	Datum 1910	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Futter und Zulagen täglich: Fleischpulver bzw. Konservenfleisch g		destill. Wasser ccm	Fett g	CaO als Zulage g	Urin: währ. der Periode ccm	Urin: täglich ccm	Kot: währ. der Periode g	Kot: täglich g
1	4.— 6. II.	3	10300	80	Fleischpulver	300	—	—	600	200	45	15,0
2	7.— 9. II.	3	10100	80		500	—	—	1215	405	40	13,3
3	10.—13. II.	4	10230	160		500	—	—	1150	287,5	75	18,75
4	14.—18. II.	5	9930	128		500	—	—	1230	246	145	29,0
5	19.—23. II.	5	10100	160		500						
6	24.—28. II.	5	10050	160		500	—	—	5150	343,3	415	27,7
7	1.— 5. III.	5	10040	160		500						
8	6.— 9. III.	4	10100	160		500	—	0,1125	1440	360	215	53,75
9	10.—14. III.	5	9980	160		500	—	0,2250	1815	363	100	20,0
10	15.—18. III.	4	9980	160		500	—	0,5626	1610	402,5	110	27,5
11	19.—23. III.	5	10025	220		500	—	0,5626	1935	387	195	39,0
12	24.—28. III.	5	10300	750	Kons.-Fleisch	150	—	0,5124	2555	511	90	18,0
13	29. III.-1. IV.	4	10300	750		150	—	0,5124	2225	556	65	16,23
14	2.— 6. IV.	5	10650	750		150	50	0,5124	2725	545	195	39,0
15	7.—11. IV.	5	11040	750		150	50	2,5115	2570	514	125	25,0

Tabelle III. N-Stoffwechsel.

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung: durch Urin in der Periode g	durch Urin täglich g	durch Kot i. d. Periode g	durch Kot täglich g	Gesamtmenge in der Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen in der Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz in der Periode g	Bilanz täglich g
1	3	27,860	9,287	1,547	0,516	29,407	9,803(2)	94,7	5,3	27,233	9,078	— 2,174	— 0,725
2	3	27,328	9,109	1,383	0,461	28,711	9,570	95,2	4,8	27,233	9,078	— 1,478	— 0,493
3	4	51,555	12,889	3,318	0,830	54,873	13,719	94,0	6,0	72,621	18,155	+ 17,748	+ 4,437
4	5	74,235	14,847	5,968	1,194		16,041	92,6	7,4	72,621	14,524	— 7,582	— 1,517
5	5												
6	5	265,020	17,668	15,867	1,058	280,887	18,726	94,4	5,6	272,338	18,155	— 8,549	— 0,571
7	5												
8	4	69,020	17,255	6,637	1,659	75,657	18,914	91,2	8,8	72,621	18,155	— 3,036	— 0,759
9	5	89,180	17,836	3,640	0,728	92,820	18,564	96,1	3,9	90,776	18,155	— 2,044	— 0,409
10	4	75,880	18,970	4,004	1,001	79,884	19,971	95,0	5,0	72,621	18,155	— 7,263	— 1,816
11	5	118,174	23,635	7,712	1,542	125,886	25,177	93,9	6,1	124,817	24,963	— 1,069	+ 0,214
12	5	111,265	22,253	3,263	0,653	114,528	22,906	97,1	2,9	121,695	24,339	+ 7,167	+ 1,433
13	4	87,850	21,963	2,712	0,678	90,562	22,641	97,0	3,0	97,356	24,339	+ 6,794	+ 1,698
14	5	108,990	21,798	5,515	1,103	114,505	22,901	95,2	4,8	121,695	24,339	+ 7,190	+ 1,438
15	5	103,880	20,776	3,937	0,787	107,817	21,563	96,3	3,7	121,695	24,339	+ 13,877	+ 2,775

Tabelle IV. P_2O_5-Stoffwechsel.

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung durch Urin in der Periode g	durch Urin täglich g	durch Kot i. d. Periode g	durch Kot täglich g	Gesamtmenge in der Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen in der Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz in der Periode g	Bilanz täglich g
1	3	4,620	1,540	0,402	0,134	5,022	1,674	92,0	8,0	4,199	1,400	− 0,823	− 0,274
2	3	4,416	1,472	0,418	0,139	4,834	1,611	91,2	8,8	4,199	1,400	− 0,635	− 0,211
3	4	10,650	2,663	0,718	0,179	11,368	2,842	93,7	6,3	11,199	2,800	− 0,169	− 0,042
4	5	11,475	2,295	1,140	0,228	12,615	2,523	91,0	9,0	11,199	2,240	− 1,416	− 0,283
5	5												
6	5	40,640	2,709	3,472	0,231	44,112	2,940	92,1	7,9	41,995	2,800	− 2,117	− 0,140
7	5												
8	4	10,166	2,542	2,204	0,551	12,370	3,093	82,2	17,8	11,199	2,800	− 1,171	− 0,293
9	5	12,840	2,568	1,510	0,302	14,350	2,870	89,5	10,5	13,998	2,800	− 0,352	− 0,070
10	4	9,380	2,470	1,688	0,422	11,568	2,892	85,4	14,6	11,199	2,800	− 0,369	− 0,092
11	5	15,640	3,128	3,301	0,660	18,941	3,788	82,6	17,4	19,248	3,850	+ 0,307	+ 0,062
12	5	13,915	2,783	2,899	0,580	16,814	3,363	82,8	17,2	18,353	3,671	+ 1,539	+ 0,308
13	4	11,675	2,919	2,526	0,631	14,201	3,551	82,2	17,8	14,682	3,671	+ 0,481	+ 0,121
14	5	13,987	2,797	5,663	1,133	19,650	3,930	71,2	28,8	18,352	3,671	− 1,297	− 0,260
15	5	8,645	1,729	6,600	1,320	15,245	3,049	56,7	43,3	18,352	3,671	+ 3,108	+ 0,622

Tabelle V. CaO-Stoffwechsel.

1	3	0,071	0,024	0,518	0,173	0,589	0,196	12,2	87,8	0,070	0,023	− 0,519	− 0,173
2	3	0,064	0,021	0,503	0,167	0,567	0,189	11,1	88,9	0,070	0,023	− 0,497	− 0,166
3	4	0,187	0,047	0,927	0,232	1,114	0,279	16,8	83,2	0,187	0,047	− 0,927	− 0,232
4	5	0,179	0,036	1,381	0,276	1,560	0,312	11,5	88,5	0,187	0,037	− 1,373	− 0,275
5	5												
6	5	0,592	0,039	3,796	0,253	4,388	0,292	13,4	86,6	0,701	0,047	− 3,687	− 0,245
7	5												
8	4	0,175	0,044	2,385	0,596	2,560	0,640	6,9	93,1	0,637	0,159	− 1,923	− 0,481
9	5	0,214	0,043	1,790	0,358	2,004	0,401	10,7	89,3	1,359	0,272	− 0,645	− 0,129
10	4	0,226	0,057	2,370	0,592	2,596	0,649	8,8	91,2	2,437	0,609	− 0,159	+ 0,040
11	5	0,300	0,060	5,393	1,079	5,693	1,139	5,3	94,7	3,134	0,627	− 2,559	− 0,512
12	5	0,412	0,082	5,358	1,072	5,770	1,154	7,1	92,9	2,828	0,566	− 2,942	− 0,588
13	4	0,408	0,102	4,225	1,056	4,633	1,158	8,8	91,2	2,262	0,566	− 2,371	− 0,593
14	5	0,473	0,095	9,679	1,936	10,152	2,031	4,7	95,3	2,828	0,566	− 7,324	− 1,465
15	5	0,531	0,106	9,291	1,858	9,822	1,964	5,4	94,6	12,824	2,565	+ 3,002	+ 0,601

Tabelle VI. MgO-Stoffwechsel.

1	3	0,149	0,050	0,151	0,050	0,300	0,100	50	50	0,352	0,117	+ 0,052	+ 0,017
2	3	0,166	0,055	0,271	0,090	0,437	0,145	37,9	62,1	0,352	0,117	− 0,085	− 0,028
3	4	0,359	0,090	0,281	0,070	0,640	0,160	56,3	43,7	0,939	0,235	+ 0,299	+ 0,075
4	5	0,377	0,075	0,505	0,101	0,882	0,176	42,6	57,4	0,939	0,188	+ 0,057	+ 0,012
5	5												
6	5	0,732	0,049	1,918	0,128	2,650	0,177	27,7	72,3	3,520	0,235	+ 0,870	+ 0,058
7	5												
8	4	0,146	0,037	0,985	0,246	1,131	0,283	13,1	86,9	0,939	0,235	− 0,192	− 0,048
9	5	0,182	0,036	0,548	0,110	0,730	0,146	24,7	75,3	1,173	0,235	+ 0,443	+ 0,089
10	4	0,233	0,058	0,541	0,135	0,774	0,193	30,1	69,9	0,939	0,235	+ 0,165	+ 0,042 (1)
11	5	0,374	0,075	1,119	0,224	1,493	0,299	25,1	74,9	1,613	0,323	+ 0,120	+ 0,024
12	5	0,289	0,058	0,904	0,181	1,193	0,239	24,3	75,7	1,774	0,355	+ 0,581	+ 0,116
13	4	0,146	0,037	0,862	0,215	1,008	0,252	14,7	87,3	1,419	0,355	+ 0,411	+ 0,103
14	5	0,191	0,038	1,521	0,304	1,712	0,342	11,1	88,9	1,774	0,355	+ 0,062	+ 0,013
15	5	0,391	0,078	0,885	0,177	1,276	0,255	30,6	69,4	1,774	0,355	+ 0,498	+ 0,100

Der Versuch wurde an einem männlichen Hunde von 10,970 kg Körpergewicht angestellt, die Versuchsbedingungen waren dieselben wie früher, und auch die Methodik und der Gang der chemischen Untersuchung zeigt keinerlei Abweichungen gegenüber den in der ersten Mitteilung geschilderten Versuchen.

Aus den vorstehenden Tabellen ergibt sich, daß das Tier vor Beginn des eigentlichen Versuches 6 Tage bei einer gleichen Kost von 80 g Fleischpulver und 300 ccm destilliertem Wasser gehalten wurde und dabei an Körpergewicht wesentlich einbüßte. Am Ende der ersten Periode beträgt dieses 10,300 kg. Der Hund hat also innerhalb 6 Tagen 670 g abgenommen. Diese Nahrung von 80 g Pferdefleisch und 300 ccm Wasser ist mithin eine ungenügende. Das ergibt sich auch aus den Zahlen des Stickstoffwechsels. Der Hund verliert in der ersten Periode von 3 Tagen 2,174 g N, was einen täglichen Stickstoffverlust von 0,725 g N oder 4,53 g Eiweiß bedeutet. Demgemäß mußte auch ein Phosphorsäureverlust eintreten und die Bilanz eine negative sein. Aber der Verlust ist größer, als man nach der Stickstoffbilanz erwarten konnte. Das Verhältnis des Stickstoffs zur Phosphorsäure in der Nahrung und wahrscheinlich auch im Muskelfleisch des Hundes beträgt ungefähr 6,5 : 1. Man kann zwar nicht ohne weiteres annehmen, daß der Hund nur Muskeleiweiß verloren hätte, aber der Hauptverlust dürfte doch die Muskulatur betreffen.

In diesem Falle müßte die Phosphorsäurebilanz — 0,112 g betragen, In Wirklichkeit scheidet jedoch das Tier 0,274 g P_2O_5 mehr aus, als es einnimmt, also 0,162 g mehr als seinem Stickstoffverlust entspricht. Die Phosphorsäurebilanz muß infolgedessen noch von einem anderen Faktor als dem Stickstoff abhängen. Diesen können wir im Kalkumsatz suchen.[1]) Wir sehen nämlich, daß auch die Kalkbilanz in der ersten Periode negativ ist und — 0,173 g CaO täglich beträgt. Wenn wir die Zahlen 0,162 g P_2O_5, den Mehrverlust an Phosphorsäure, und — 0,173 g CaO zusammenstellen, so kommt man unwillkürlich auf den Gedanken, daß der Kalk als Tricalciumphosphat ausgeschieden worden ist. Da das Verhältnis von $CaO : P_2O_5$ in dieser Verbindung 168 : 142 beträgt, so müßte man dem Phosphorsäureverlust entsprechend 0,190 g CaO finden, also mehr als tatsächlich analysiert wurde. Wer die Methodik von Stoffwechseluntersuchungen und insbesondere der mineralischen Bestandteile des tierischen Organismus kennt, der wird nicht erwarten, daß die tatsächlich gefundenen Zahlen mit den berechneten Werten ganz genau übereinstimmen. Dies berechtigt uns im vorliegenden Falle zu der Annahme, daß der zu Verlust gegangene Kalk tatsächlich als phosphorsaurer Kalk dem Körper entnommen ist.

[1]) Vgl. dazu C. v. Noorden, Handb. d. Pathol. d. Stoffw., Berlin 1907 und A. Albu und C. Neuberg, Physiol. und Pathol. d. Mineralstoffw., Berlin 1906.

Eine andere Frage ist die, ob der Kalk, der ja zum weitaus größten Teil, nämlich zu 87,8%, in dieser Periode durch den Kot entleert wird, auch schließlich als phosphorsaurer Kalk den Organismus verläßt. Wir finden eine Phosphorsäureausscheidung von 0,134 g durch den Kot. Diesem Wert entspräche 0,159 g CaO. In Wirklichkeit wird etwas mehr Kalk ausgeschieden, so daß man zu der Annahme kommt, daß der Kalk auch noch zu einem geringen Teil in anderer Form eliminiert wird.

Daß im Darm eine Substanz — nach unserer Auffassung der Kalk — vorhanden ist, die die Phosphorsäure gewissermaßen zwingt, den Körper statt durch den Urin mit dem Kot zu verlassen, erhellt auch schon aus den Zahlen der Verteilung des Stickstoffs und der Phosphorsäure im Kot und Urin. Während vom Stickstoff 94,7% mit dem Urin und nur 5,3% durch den Kot ausgeschieden werden, verläßt die Phosphorsäure zu 8% durch den Kot und zu 92% durch den Urin den Körper. Der Anteil der Kotphosphorsäure ist also größer als der des Kotstickstoffs.

In der zweiten Periode, die wiederum 3 Tage dauerte und die sich von der ersten nur dadurch unterschied, daß anstatt 300 ccm 500 ccm Wasser täglich gereicht wurden, sehen wir im großen ganzen dieselben Verhältnisse.

Die Stickstoffbilanz zeigt das Bestreben, sich ins Gleichgewicht einzustellen, denn der tägliche Verlust ist wesentlich kleiner geworden und beträgt nur noch — 0,493 g N, was einem Eiweißverlust von 3,081 g entspricht. Das Körpergewicht hat um weitere 200 g abgenommen. Das Tier hat also offenbar außer Eiweiß auch andere Körperbestandteile verloren. Die P_2O_5-Bilanz ist demzufolge ebenfalls negativ, und auch hier ist der Verlust stärker, als man nach der N-Bilanz anzunehmen berechtigt war. Man hätte 0,076 g P_2O_5-Verlust anstatt — 0,211 g P_2O_5 erwartet. Es werden also wieder 0,135 g zu viel ausgeschieden. Dieser Mehrverlust kann auch hier wieder mit der Bilanz des Kalkstoffwechsels in Zusammenhang gebracht werden. Er würde 0,160 g CaO entsprechen. In Wirklichkeit wird auch diese Menge zuviel ausgeschieden, nämlich 0,166 g. Die kleine Abweichung liegt im Bereich analytischer Fehlerquellen. Die Menge der durch den Kot eliminierten P_2O_5- und CaO-Menge legt auch hier den Gedanken nahe, daß diese beiden Substanzen als Tricalciumphosphat im Kote sich vorfinden. Ebenso wie in der ersten Periode ist auch die Verteilung des Kot- und Harnstickstoffs und der P_2O_5 so beschaffen, daß die Annahme gerechtfertigt erscheint, die Phosphorsäure werde wegen des Kalkgehalts des Kotes in höherem Verhältnis als der Stickstoff durch diesen ausgeschieden. Während der Versuchshund in der Periode I nur 300 ccm Wasser erhielt, werden ihm nunmehr in der Folgezeit 500 ccm gereicht. Ein Einfluß auf den Soffwechsel infolge der Vermehrung der Diurese von 200 ccm Urin auf 405 ccm in Periode II läßt sich aber nicht feststellen. Die untersuchten Körpersubstanzen werden keinesfalls in erhöhtem Maße durch den Urin ausgeschieden.

Die 3. Periode ist insofern bemerkenswert, als dem Hunde nunmehr die doppelte Futterration gereicht und dadurch eine erhebliche Stickstoffretention erzielt wird. Die positive Bilanz beträgt 4,437 g N,

was bei Organisation des Stickstoffs 27,7 g Körpereiweiß entspricht. Damit ist auch eine Zunahme des Körpergewichts um 130 g verbunden. Auf Grund dessen war eine positive Bilanz sowohl der Phosphorsäure wie des Kalks zu erwarten, da ja auch diese Substanzen in vermehrter Menge dem Körper zugeführt werden. Aber beide Bilanzen sind negativ. Die der Phosphorsäure zwar nur in geringem Grade, die des Kalks hat aber noch höhere negative Werte erreicht als in den früheren Perioden. Stellen wir auch in der 3. Periode eine analoge Rechnung für das Verhältnis der N-, P_2O_5- und CaO-Bilanz auf, so ergeben sich die folgenden Werte. Den retinierten 4,437 g N entspräche eine positive Phosphorbilanz von 0,682 g, tatsächlich werden sogar 0,042 g mehr ausgeschieden als vereinnahmt wurden; es werden also im ganzen 0,682 g + 0,042 g = 0,724 g P_2O_5 mehr ausgeschieden, als man nach dem Stickstoffansatz erwarten durfte. Dieser großen Menge steht aber eine nicht annähernd analoge Menge Kalk gegenüber; denn den — 0,232 g CaO entsprechen nur 0,202 g P_2O_5. Die Rechnung geht also hier nicht auf. Man könnte glauben, daß der Stickstoff nicht organisiert worden ist, da nach Voit für diesen Vorgang besonders die gleichzeitige Retention der mineralischen Körperbestandteile plädiert. Aber andererseits ist z. B. die Magnesia zurückgehalten worden, denn die Bilanz ist positiv, und die Körpergewichtszunahme beweist einen Ansatz des Stickstoffs als Körpereiweiß. Wir geben infolgedessen zu, daß wir uns in dieser Periode die Abhängigkeit der genannten Substanzen nicht so einfach erklären können als in den früheren. Auffallend ist auch hier die Verteilung des Stickstoffs und der Phosphorsäure in Kot und Urin, da die Zahlen ungefähr auf gleicher Höhe verlaufen. Immerhin zeigen uns die Werte der durch den Kot ausgeschiedenen CaO und P_2O_5, daß beide zum größten Teil wohl als Tricalciumphosphat den Organismus verlassen; denn der Kotphosphorsäure entsprechen 0,212 g CaO, was nahe an den gefundenen Wert heranreicht. Was für uns aber in dieser Periode das Wichtigste war, ist der Umstand, daß die Kalkbilanz nicht allein negativ war, sondern der Kalkverlust noch größer wurde als vorher! Man konnte zunächst wohl daran denken, daß die mit dem Fleisch eingegebene Kalkmenge nicht resorbiert worden war. Aber gerade die Werte des durch den Urin ausgeschiedenen, also sicher resorbierten Kalks zeigen uns, daß eine erhöhte Resorption stattgefunden hat, denn die Werte des Urinkalks sind wesentlich höhere als in den früheren Perioden und sind sogar genau so groß als die der Einnahme. Es mußte deshalb ein anderer Faktor für die Bildung der negativen Kalkbilanz verantwortlich gemacht werden. Was sich gegen früher geändert hat, ist die Nahrungsmenge, und es ist nichts plausibler als diese als Grund dafür anzusprechen. Über die Art des Einflusses der Nahrung auf die Kalkbilanz kann man sich die verschiedensten Vorstellungen machen. Was auch schon in den früheren Versuchen auffiel, ist die Zunahme der Kotmenge. Aber sie ist doch nur sehr geringfügig, was an und für sich jedoch noch nicht gegen eine solche Abhängigkeit sprechen würde. Dann aber müßte sich eine solche Abhängigkeit in allen Perioden, wenigstens von Nr. 1 bis 7,

konstatieren lassen. Dies ist aber nicht der Fall: denn bei 27 g Kot pro Tag ist die Kalkausscheidung kaum größer als bei 18,75 g. Allerdings ist bei diesen Vergleichen zu bedenken, daß wir nur das Gewicht des frischen Kotes festgestellt haben, während die Menge des Trockenkotes vielleicht eine engere Beziehung ergeben hätte.

Wir wollen es vorläufig dahingestellt sein lassen, ob man sich das Ganze nicht auch anders vorstellen könnte. Sicher ist es immerhin, daß die Vermehrung der Nahrung eine Vergrößerung der Kalkausscheidung bedingt und die Bilanz stärker negativ gestaltet als vorher.

In Periode IV erhielt der Hund etwas weniger Futter, da er schlechter fraß und am 1. Tage etwas von seiner Ration übrig gelassen hatte. Infolgedessen nahm das Tier an Körpergewicht wieder ab und wies eine negative Stickstoffbilanz von — 1,517 g auf. Auch die Phosphorsäure- und Kalkbilanz sind negativ. Die früher aufgestellte Rechnung würde ergeben: Dem Stickstoffverlust entspricht ein P_2O_5-Verlust von 0,233 g. In Wirklichkeit werden also auch hier 50 mg mehr ausgeschieden, als man erwarten konnte.

Die Verhältnisse liegen hier ähnlich wie in der vorhergehenden Periode, wenn auch die Rechnung nicht vollkommen aufgeht.

Im großen und ganzen dasselbe Bild sehen wir in den folgenden drei Perioden, die wir zusammenfassen mußten, weil die Abgrenzung des Kotes nicht ganz einwandfrei gelang.

Das Auffallendste in den Perioden III, IV und V bis VII ist der Umstand, daß die negative Kalkbilanz ziemlich den gleichen Wert behält und immer größer ist, als man nach der des Stickstoffs annehmen und erwarten mußte. Allerdings kommt man bei einem aufmerksamen Vergleich der Zahlen zu der Ansicht, daß auch die Bilanz des Stickstoffs nicht ohne Einfluß auf den Kalkumsatz sein könne. Beim Ansatz von Stickstoff finden wir die kleinsten Werte, bei dem größten Verlust in Periode IV auch den größten Kalkverlust. Wenn wir annehmen, daß mit dem Stickstoff der Kalk in demselben Verhältnis retiniert wird oder zu Verlust geht, wie die beiden Substanzen in der Nahrung vorhanden sind, so würde mit dem Stickstoffansatz in der Periode III 0,012 g angesetzt werden müssen. Tatsächlich geht aber 0,232 g CaO zu Verlust. Ohne den Stickstoffansatz, bei Gleichgewicht, würde also 0,232 + 0,012 g die negative Kalkbilanz bilden. Bei Berechnung der übrigen Perioden IV und V bis VII würde die Kalkbilanz durch 0,275 — 0,04 g und 0,245 — 0,001 g gebildet werden. Also die tatsächlichen Werte der Kalkbilanz würden alsdann in Periode III — 0,244 g, Periode IV 0,235 g und Periode V bis VII — 0,244 g CaO betragen. Das sind annähernd oder genau die gleichen Zahlen. Wir möchten diese Werte als die absolute Kalkbilanz bezeichnen, die bei einer Nahrung von 160 g Fleischpulver diese Größe erreicht. Aus dieser Berechnung, die man nach unserer Meinung anzustellen berechtigt ist, geht einmal hervor, daß die Kalkbilanzen nichts mit der Kotmenge zu tun haben und von dieser nicht abhängig sind und dann, daß die Stickstoffbilanz einen Einfluß nach Maßgabe des in der Nahrung vorhandenen Kalks ausübt.

In den folgenden Perioden 8 bis 11 wird dem Tier das gleiche Futter weiter verabreicht, aber mit dem Unterschied, daß wir nunmehr versuchen, durch Zulage eines Kalksalzes zur Nahrung Kalkgleichgewicht herzustellen. In der 4tägigen Periode Nr. 8 ist die Kalkzulage eine geringe, sie beträgt nicht mehr als 0,1125 g täglich CaO, das als Calciumchlorid dargereicht wird. Die Menge des Urins ist kaum größer als vorher, so daß von einer die Diurese befördernden Wirkung noch nicht gesprochen werden könnte. Jedoch zeigen die Urinmengen der folgenden Perioden, daß dem Kalk in Gestalt des Calciumchlorids eine diuretische Wirkung zukommt, denn die Urinmengen weisen unter größeren Kalkzulagen eine steigende Tendenz auf, wenn wir sehen, daß sie von 343 auf 402 ccm sich erhöhen. Auch die Menge des frischen Kotes ist erheblich höher als vorher. Der N-Stoffwechsel zeigt in der 8. Periode keine auffällige Änderung gegen vorher, nur die Verteilung des Stickstoffs zwischen Kot und Urin ist etwas anders geworden und hat sich zuungunsten des Urins geändert, da der Anteil des Urinstickstoffs 91% beträgt und um 3% zurückgegangen ist. Doch wagen wir nicht, diese Änderung als eine Folge der Kalkzulage hinzustellen, da wir sehen, daß schon in der nächsten Periode der Urinstickstoff 96,1% der Gesamtmenge beträgt. Dagegen sehen wir beim Phosphorsäurestoffwechsel recht erhebliche Änderungen auftreten. Die tägliche Bilanz ist bedeutend stärker negativ als vorher, denn sie steigt bei nur wenig veränderter N-Bilanz von — 0,140 g auf — 0,293 g. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Menge der durch den Kot ausgeschiedenen P_2O_5 erheblich zugenommen hat, während die Urinphosphorsäure sogar ein wenig zurückgegangen ist. Demzufolge ist auch die Verteilung der P_2O_5 in Kot und Urin stark verändert. Wurden früher 7,9% der Gesamtmenge durch den Kot ausgeschieden, so erreicht nunmehr die Kotzahl den vorher noch nicht vorhandenen Wert von 17,8%. Daß die Menge des täglichen P_2O_5-Verlustes viel größer ist, als es dem Stickstoffverlust entspricht, bedarf keiner Erwähnung.

Verständlich werden uns diese Veränderungen in der Phosphorsäureausscheidung durch Betrachtung der Verhältnisse des Kalkstoffwechsels. In dieser Periode ist die Kalkbilanz ganz gegen unser Erwarten stärker negativ als vorher. Die Kalkzulage hat also in dieser Beziehung nichts genützt. Es hat sogar den Anschein, daß sie geschadet hat. Denn selbst wenn der Zulagekalk gar nicht resorbiert worden wäre, so hätte der Organismus doch noch mehr Kalk als vorher verloren. Eine Erklärung für diese eigentümliche paradoxe Erscheinung vermögen wir nicht zu geben. Die Ausscheidung durch den Urin ist nahezu die gleiche geblieben, und die Zunahme der negativen Bilanz ist ausschließlich der Vermehrung des Kotkalks zuzuschreiben. Dies drückt sich natürlicherweise durch die Verteilungszahlen in Prozenten der durch Urin und Kot ausgeschiedenen Kalkmengen deutlich aus; denn die durch den Urin ausgeschiedene Menge sinkt von 13,4% auf 6,9%. Auf Grund dieser Veränderung wird man zu der Annahme geführt, daß die Zunahme des durch den Kot ausgeschiedenen Kalks auch die Phosphor-

säureausscheidung in demselben Sinne beeinflußt hat. Zwar wird mehr Phosphorsäure durch den Kot ausgeschieden, als dem Kalk entspricht, wenn dieser als Tricalciumphosphat den Körper verlassen würde, und es würden nicht 0,596 g CaO, sondern 0,652 g CaO durch den Kot eliminiert werden müssen. Da manches, was sich schon aus dieser Periode ergeben würde, in der Folge deutlicher zutage kommt, so verzichten wir hier zunächst auf weitere Erörterungen und registrieren nur die Tatsache, daß auch die Magnesiabilanz negativ geworden ist und die Menge des durch den Urin ausgeschiedenen Anteils erheblich zurückgegangen ist.

In der nächsten Periode Nr. 9 wird dem Hunde die doppelte Kalkmenge zum Futter gegeben. Die Folgen spiegeln sich besonders in den Zahlen wider, die den Phosphorsäure- und Kalkstoffwechsel des Tieres anzeigen, während auch hier der N-Stoffwechsel wenig einschneidende Veränderungen erfährt. Die negative Kalkbilanz wird nunmehr bedeutend geringer, und demgemäß ist die Phosphorsäurebilanz ebenfalls auf einen geringeren negativen Wert gesunken. Wenn man wie früher annimmt, daß die P_2O_5 im selben Verhältnis zum Stickstoff ausgeschieden wird, wie diese Substanzen im Futter vorhanden sind, so müßte sie mit 0,409 g N 0,063 g P_2O_5 eliminiert werden, was nahezu der Gesamtmenge der negativen P_2O_5-Bilanz entspricht. Für die Mengen des Kalks von — 0,129 g (die negative Bilanz) würden also dem Körper des Hundes kaum P_2O_5 entzogen worden sein. Und doch hat der Kalk den Organismus wahrscheinlich als Tricalciumphosphat verlassen, denn wir sehen der Menge des Kotkalks von 0,358 g eine P_2O_5-Menge von 0,302 g entsprechen. Die Rechnung ergäbe der Phosphorsäuremenge entsprechend 0,357 g CaO. Ausdrücklich heben wir hervor, daß dieses vielleicht zufällige Zusammentreffen von berechneten und gefundenen Werten noch keineswegs mit zwingender Sicherheit für die Ausscheidung des Kalks als $Ca_3(PO_4)_2$ spricht. Aber man wird sich auch andererseits dem Eindruck nicht verschließen können, daß der Kalk und die Phosphosäure im Kot in einem bestimmten Abhängigkeitsverhältnis stehen.

Es ergibt sich jedenfalls so viel, daß der Kalk, den wir als salzsaures Salz gaben, dem Körper Phosphorsäure nicht zu entziehen braucht, ja daß vielmehr der Organismus vor Phospohorsäureverlust bewahrt werden kann: ist doch der Körper nicht mehr gezwungen, den Kalk, den er aus irgendeinem Grunde durch den Darm im Übermaß ausscheidet, seinem eigenen Vorrat an phosphorsaurem Kalk zu entnehmen, sondern er braucht den ihm mit der Nahrung zugeführten Kalk. Fragen wir uns, ob dieser Kalk resorbiert worden ist, so müssen wir diese Frage zunächst schon deshalb bejahen, weil nach unserem heutigen Wissen ein lösliches Kalksalz ohne weiteres im Dünndarm resorbiert wird, und weil wir sehen, daß die Ausscheidung mit größter Wahrscheinlichkeit als phosphorsaurer Kalk erfogt. Daß die Bindung zu diesem Salz etwa im Darm erfolgt, indem der Kalk unresorbiert bleibt und die Phosphorsäure erst in den Darm zum Zwecke der Bindung ausgeschieden wird, wäre eine durch nichts zu rechtfertigende Annahme. Plausibel ist allein die Elimination des resorbiert gewesenen Kalks als phosphorsaures Salz.

In der 10. Periode liegen die Verhältnisse wohl ähnlich, wenn auch durch die vermehrte Kalkzulage nicht gleich.

Die tägliche Kalkzulage wird auf 0,5626 g CaO gesteigert. Ob die Vermehrung der negativen Stickstoffbilanz auf — 1,816 g täglich auf die Kalkzulage zurückgeführt werden darf, wagen wir nicht zu entscheiden. Auffallender ist die Vermehrung der Urinmenge und besonders der Umstand, daß der Kalkstoffwechsel des Tieres nunmehr nahezu im Gleichgewicht sich befindet; denn nur noch 0,040 g CaO werden mehr ausgeschieden als eingenommen wurden. Da mit den zu Verlust gegangenen Stickstoffmengen wohl erhebliche Mengen Phosphorsäure mit hätten verloren gehen müssen, nach unseren früheren Berechnungen 0,279 g N, so hat die tatsächlich gefundene Bilanz von 0,092 g P_2O_5 etwas Überraschendes; denn es werden 0,187 g P_2O_5 weniger eliminiert, als man erwarten mußte.

Die Verteilung der Phosphorsäure und des Kalks in Urin und Kot hat sich nicht wesentlich gegen früher verschoben; und auch jetzt ist ein Vergleich der Kalk- und Phosphorsäuremengen, die durch den Kot ausgeschieden werden, insofern lehrreich, als sie sich gegen früher im gleichen Sinne geändert haben, daß also eine gewisse Abhängigkeit beider voneinander besteht, wenn auch der ausgeschiedenen CaO-Menge mehr P_2O_5 entsprechen würde als tatsächlich gefunden wurde. Eine solche Abhängigkeit kann man aber nicht zwischen der Menge der durch den Kot ausgeschiedenen Magnesia und der entsprechenden Phosphorsäuremenge bemerken. Auch auf Grund dieser Zahlenvergleiche gewinnt die Annahme von der Ausscheidung des Kalks als phosphorsaures Salz an Wahrscheinlichkeit.

So ist es nun durch die steigenden Zulagen eines Kalkzusalzes zu der Nahrung gelungen, wenigstens annähernd Kalkgleichgewicht herzustellen. Dabei ist es besonders erwähnenswert, daß nicht allein die Mengen CaO zu dem Futter zugesetzt werden mußten, die nach der Größe der negativen Bilanz ursprünglich zu fehlen schienen, sondern es waren wesentlich größere Mengen nötig, um Gleichgewicht zu erreichen.

Nachdem wir so weit waren, mußten wir sehen, ob die Menge der von uns verabreichten Nahrung in der Tat, wie die früheren Versuche zu zeigen schienen, die Kalkbilanz derart beeinflußt, daß bei Vergrößerung der Nahrungsmenge die Kalkbilanz im ungünstigen Sinne in Mitleidenschaft gezogen wurde. Wir stiegen also mit der Futtermenge um 60 g Pferdefleischpulver täglich, ließen aber die Kalkzulage unverändert. Was vermutet wurde, tritt ein; denn — trotz einer Stickstoffretention von 0,214 g, mit der bei Organisation des Stickstoffs eine gewisse Kalkretention hätte verbunden sein müssen — sehen wir, daß die Kalkbilanz den höchsten bisher erreichten negativen Wert von — 0,512 g zeigt. Gleichzeitig wird Phosphorsäure retiniert, und zwar mehr als man nach der Stickstoffretention erwarten konnte. Der Organismus hat also zwar Kalk verloren, d. h. mehr ausgeschieden als er eingenommen hat, aber die Phosphorsäurebilanz ist dadurch nicht beeinflußt worden, obwohl ein Vergleich der Zahlen, die die Kalk- und Phosphorsäureausscheidung im

Kot angeben, deutlich erkennen läßt, daß mindestens zum Teil der Kalk als phosphorsaures Salz ausgeschieden ist; wenn auch weniger Phosphorsäure durch den Kot eliminiert wird, als dem Kalk entsprechen würde.

Bezüglich der Verteilung des Stickstoffs, Kalks und der Phosphorsäure in Urin und Kot sind besondere Wahrnehmungen nicht zu machen, und auf die Verhältnisse der Verteilung der Magnesia soll später näher eingegangen werden.

In der 12. Periode, die wiederum 5 Tage dauerte, wird dem Tiere nunmehr konserviertes Pferdefleisch dargereicht, und zwar in einer Menge, die ungefähr 220 g Fleischpulver entsprechen. Die Kalkzulage ist, da die neu bereitete Kalklösung etwas schwächer ist, um ein geringes kleiner. Die Stickstoffbilanz in dieser Periode ist günstiger als früher und beträgt + 1,433 g N täglich. Auffallend ist die geringe Menge des Kotstickstoffs, der nur 2,9% des gesamten Stickstoffs beträgt, so daß eine bessere Ausnützung des Eiweißes die Folge ist. Die Phosphorsäurebilanz ist demzufolge auch positiv, aber auch hier wird mehr P_2O_5 retiniert, als man nach der N-Bilanz erwarten konnte. Die Kalkbilanz ist um ein geringes stärker negativ, da die Einnahme etwas kleiner ist und der Kalkbedarf offenbar der gleiche geblieben ist. Aus dieser Periode geht auch die Tatsache hervor, daß der Kotstickstoff keinen Einfluß auf die Kalkbilanz ausübt; denn obwohl die Menge des Kotstickstoffs wesentlich geringer ist als in Periode 11, so ist die Kalkbilanz ungefähr dieselbe. In dieser Periode wird wie in der vorigen höchstens ein Teil des Kalks als phosphorsaures Salz durch den Kot ausgeschieden. Ein großer Teil des Kalks muß den Organismus in anderer Bindung verlassen. Man könnte dabei zu der Ansicht neigen, daß der Kalk, der als Zulage gegegeben wird, nicht resorbiert wird und eben als ein salzsaures Salz ausgeschieden wird. Zweifellos tritt mit der Erhöhung des Kotkalks, der ja hauptsächlich die negative Kalkbilanz bedingt, eine Mehrausscheidung der Kotphosphorsäure ein, so daß man eben annehmen muß, daß ein Teil des eingegebenen Kalks wenigstens resorbiert und mit der P_2O_5 wieder eliminiert wird. Außerdem sieht man an den Mengen Kalk, die durch den Urin ausgeschieden werden, daß eine vermehrte Resorption von Kalk stattgefunden hat. Im wesentlichen zeigen die Perioden 12 und 13 den gleichen Verlauf.

In der folgenden Periode wird eine bedeutsame Änderung der Nahrung vorgenommen; denn das Tier erhält nunmehr zu seiner früheren Kost noch täglich 50 g Fett. Diurese und Kotmenge bleiben davon zunächst wohl im wesentlichen unbeeinflußt. Das Körpergewicht aber nimmt ganz erheblich zu, obwohl die Stickstoffbilanz etwa dieselben positiven Werte zeigt wie in den vorhergehenden Perioden. Es muß also wohl auch Fett neben dem Stickstoff zum Ansatz gekommen sein.

Auffallend verhält sich nunmehr die Phosphorsäurebilanz. Während sie in den 3 vorhergehenden Perioden positiv gewesen war, der Organismus des Hundes also keine Phosphorsäure verloren hatte, so tritt jetzt plötzlich eine stark negative Bilanz von — 0,260 g P_2O_5 auf, die besonders durch eine vermehrte Ausscheidung dieses Körpers durch den Kot bedingt ist,

während die Urinausscheidung sogar um ein geringes vermindert ist. Die Verteilungszahlen der Urin- und Kotphosphorsäure werden infolgedessen zugunsten der Kotphosphorsäure geändert, die mit 28,8% die bisher höchste Ziffer erreicht und im Vergleich zu der vorigen Periode ohne Fettzulage um 11% in die Höhe schnellt.

Wenn wir die Zahlen des Kalkstoffwechsels übersehen, so kommen wir zu der Ansicht, daß die Veränderungen in der Bilanz der Phosphorsäure und ihrer vermehrten Ausscheidung durch den Kot in engstem Zusammenhang stehen mit den Veränderungen, die beim Kalk vor sich gegangen sind. Die Bilanz ist von — 0,593 g auf — 1,465 g CaO gestiegen, und die Ausscheidung durch den Kot ist von 1,056 g auf den recht beträchtlichen Wert von 1,936 g CaO täglich in die Höhe gegangen. Die Fettzulage hat also die Kalkausfuhr in sehr hohem Maße gesteigert.

In der 15. Periode wird nun wiederum der Versuch unternommen, auch dieses durch die Fettzulage hervorgerufene erhebliche Kalkdefizit durch eine Erhöhung der Kalkzulage zu decken. Es werden dem Tier täglich 2,5115 g CaO zu der Nahrung zugelegt, und sofort sehen wir, daß das Defizit gedeckt wird und die Kalkmenge, die über das Defizit hinaus im Überschuß gereicht wird, sogar zum Ansatz gelangt; denn die Kalkbilanz wird jetzt positiv und erreicht zum erstenmal den Wert von + 0,601 g. Die Stickstoffbilanz ist ebenfalls stark positiv, was sich auch in der Zunahme des Körpergewichts zu erkennen gibt. Dem entspräche natürlicherweise auch eine Zunahme der Phosphorretention. Bei Betrachtung der Phosphorsäurebilanz ergibt sich aber, daß die Retention 0,622 g P_2O_5 beträgt und, wie die Rechnung ergibt, um rund 0,200 g höher ist, als man nach der Stickstoffbilanz erwarten mußte. Mit Notwendigkeit werden wir zu der Annahme gebracht, daß ein Teil des retinierten Kalkes als phosphorsaurer Kalk zum Ansatz gekommen ist.

Trotz der starken Phosphorsäureretention wird doch durch den Kot sehr viel mehr P_2O_5 ausgeschieden als vorher, aber dafür hat sich die Ausscheidung durch den Urin sehr erheblich eingeschränkt. Die Verteilung der Phosphorsäure in Harn und Kot ist infolgedessen zugunsten des Kotes weiter verändert, so daß nunmehr nur noch 56,7% der ausgeschiedenen Phosphorsäure durch den Urin eliminiert werden.

Wenn wir noch einmal diesen Versuch von 67 Tagen übersehen, so kommen wir bezüglich des Kalkstoffwechsels zu ähnlichen Ergebnissen wie bei den früheren Versuchen. Da das Pferdefleisch eine sehr kalkarme Nahrung ist, so wäre es sehr plausibel, daß der geringe Kalkgehalt nicht ausreicht, und die Folge wäre eine negative Bilanz. Bei einer Vermehrung der Nahrung durch Zulage einer weiteren Fleischportion müßte aber der Kalkgehalt des Futters den Ansprüchen des Organismus eigentlich besser gerecht werden als vorher, da mit dieser Fleischportion eine, wenn auch geringe Menge von Kalk mehr

eingeführt wird. Zum mindesten müßte man erwarten, daß die Kalkbilanz schwächer negativ würde. Das ist aber nicht der Fall, im Gegenteil — die Kalkbilanz erreicht sogar stärkere negative Werte als vorher. Anders ausgedrückt bedeutet die Vermehrung der Nahrung eine Schädigung des Kalkstoffwechsels. Da das Pferdefleisch nahezu eine reine Eiweißnahrung ist (die geringen Mengen von Glykogen und Fett kommen dabei wohl kaum mehr in Betracht als die Salzmengen), so dürfen wir annehmen, daß der Eiweißgehalt der Nahrung die Ursache ist. Mit Sicherheit können wir jetzt schon sagen, daß die Größe und Menge des entleerten Kotes in frischem Zustand mit der Größe der Kalkausscheidung in keinem Zusammenhange steht, ebensowenig wie der Stickstoffgehalt des Kotes. Des weiteren sehen wir, daß durch ein zur Nahrung zugelegtes Kalksalz in passender Gabe Kalkgleichgewicht erzielt werden kann. Durch eine weitere Zulage von Fett wird das Kalkgleichgewicht allerdings gestört, da wiederum eine sehr erhebliche negative Kalkbilanz zustande kommt. Aber auch dieses Defizit kann durch erneute Kalkzulage zur Nahrung von neuem gedeckt werden. Es hat den Anschein, als ob die Zulage größer sein müßte als das Defizit.

Die Phosphorsäurebilanz wird durch die Größe der Kalkbilanz in Mitleidenschaft gezogen, wenn auch in fast allen Fällen der Einfluß des N-Stoffwechsels nicht zu verkennen ist. Allerdings muß hervorgehoben werden, daß die Bilanz der Phosphorsäure nicht nur von diesen beiden Faktoren abhängig ist, jedenfalls ergibt sich aus den Berechnungen, daß die Phosphorsäurebilanz nicht einfach das arithmetische Mittel aus diesen beiden Faktoren ist. Wie stark aber der Kalkstoffwechsel den der Phosphorsäure beeinflußt, läßt sich aus den 3 letzten Perioden entnehmen. Dadurch, daß infolge der Fettdarreichung mehr Kalk durch den Darm ausgeschieden wird als vorher, wird die Verteilung der Phosphorsäure in Harn und Kot geändert, und zwar zuungunsten des Urins. Aber auch die Bilanzen sprechen für diese Ansicht eine beredte Sprache.

Über den Magnesiastoffwechsel möchten wir uns nur mit größter Vorsicht aussprechen. Eine Abhängigkeit von den Nahrungskomponenten ist kaum zu konstatieren. Auf jeden Fall verhält er sich ganz anders als der Kalkstoffwechsel und

geht seine eigenen Wege. Aber auch eine Parallelität mit dem N-Stoffwechsel ist kaum irgendwo zu beobachten. Selbst in der Verteilung der Magnesia in Urin und Kot läßt sich irgendeine Gesetzmäßigkeit nicht bemerken. Vielleicht ist es auffallend, daß in den Versuchsperioden, in denen das Tier Kalk ansetzte oder im Gleichgewicht war, die Urinwerte der Magnesia relativ hohe wurden und etwas über 30% betrugen, während sie unter sonst gleichen Bedingungen wesentlich niedriger waren. Man könnte sich die Vorstellung machen, daß die Kalkzulagen, die Gleichgewicht bedingen, die Anwesenheit der Magnesia im Kot oder die Ausscheidung in den Darm unnötig machen.

Interessant ist eine Zusammenstellung des gesamten Versuches, der, wie gesagt, 67 Tage währte.

Tabelle VII.

	N g	P_2O_5 g	CaO g	MgO g
Die Gesamteinnahmen betrugen	1295,322	198,175	29,524	17,507
Die Gesamtausgaben waren dagegen	1195,537	201,090	41,448	14,226
Die Gesamtbilanz stellte sich infolgedessen	+ 99,785	− 2,915	− 11,924	+ 3,281

Diese Zahlen geben ein bemerkenswertes Bild, das einer Erläuterung bedarf. Das Tier hat in den 67 Tagen des Versuchs im ganzen nahezu 100 g Stickstoff retiniert. Da es an Körpergewicht gleichzeitig zugenommen hat, so ist die Annahme, daß es diesen Stickstoff auch organisiert hat, wohl zutreffend.

Nach den landläufigen Annahmen müßte man die Erwartung hegen, daß auch die Phosphorsäure retiniert worden ist. Diese Erwartung wird aber getäuscht; denn wir sehen, daß sogar ein Verlust an P_2O_5 eingetreten ist. Dieses Defizit in der Bilanz ist auf den ersten Blick scheinbar ein recht unbedeutendes. Aber bei näherem Zusehen ist selbst die Zahl — 2,915 g eine recht hohe. Wir wissen zwar nicht, in welcher Form der retinierte Stickstoff angesetzt worden ist. Die allgemeine Meinung wäre wohl die, daß er als Eiweiß dem Organismus des Versuchstieres einverleibt worden ist. Man nimmt sogar für gewöhnlich an, daß das angesetzte Eiweiß Muskel-

eiweiß geworden ist, und auch wir haben diese Annahme mehrmals machen müssen, aber es fragt sich doch, ob dies richtig sei und ob es nicht besser wäre, andere Berechnungen aufzustellen. Auf Grund von Analysen, die der eine von uns demnächst veröffentlichen wird, kommen wir zu der Ansicht, daß das Verhältnis vom Stickstoff zur Phosphorsäure, soweit sie nicht als Tricalciumphosphat in den Knochen gebunden ist, beim Hund durch die Zahlen 8:1 ausgedrückt ist.

Es würden demnach eigentlich mit den 99,785 g N oder rund 100 g N 12,5 g P_2O_5 angesetzt werden müssen. Wenn diese Mengen aber nicht retiniert werden, so müssen sie eben an einer anderen Stelle des Organismus zu Verlust gegangen sein, und wenn wir sehen, daß sogar tatsächlich rund 3 g (2,915 g) P_2O_5 mehr ausgeschieden als eingenommen wurden, so ist die Summe 12,5 + 3,0 g dieser anderen Stelle entnommen worden.

Dies kann aber nur der Knochen sein, da ja das Eiweiß aus den eben genannten Gründen kaum mehr in Betracht kommt. Zunächst müssen wir allerdings zugeben, daß ein Beweis für die Entnahme der Phosphorsäure aus den Knochen noch nicht erbracht ist. Man könnte ja neben vielen anderen Annahmen auch die machen, die noch am wahrscheinlichsten wäre, daß phosphorreiche Eiweißkörper abgebaut und dafür phosphorarme angesetzt worden wären.

Aber die Kalkbilanz zeigt uns das Irrige dieser Annahme und die Berechtigung für unsere Ansicht, daß die Phosphorsäure dem Knochen entnommen ist.

Da im Knochen die Phosphorsäure zum weitaus größten Teil an Kalk gebunden ist, so muß auch die Kalkbilanz negativ sein. In der Tat konstatieren wir, daß die Gesamtkalkbilanz den Wert von rund — 12 g CaO aufweist. Wir können nicht erwarten, daß die Zahlen der berechneten Phosphorsäure und des Kalks, die ja das Resultat einer sehr großen Anzahl von Analysen mit allen ihren nicht zu vermeidenden Fehlern sind, genau miteinander übereinstimmen.

Kann nun der Kalk, den das Versuchstier im Überschuß ausgeschieden hat, aus den Knochen stammen? Da Mengen von 12 g CaO bei dem 10,3 kg schweren Versuchstier nur in den Knochen vorkommen, so ist eine andere Quelle nicht möglich. Der Gesamtkalkgehalt beträgt beim Hunde nach

unseren eigenen Analysen 1,2%; nehmen wir aber selbst 2% an, so hatte der Hund bei einem Anfangsgewicht von 10,3 kg überhaupt nur einen Kalkgehalt von ungefähr 206 g, von denen nur etwa 1% auf die Weichteile des Hundes entfallen. Also 12 g CaO können nur aus den Knochen stammen. Wir sehen, daß unser Versuchshund ungefähr 10% seines Knochenkalks eingebüßt hat. 12 g CaO würden aber 80 g frischer Knochensubstanz entsprechen, wenn man den Kalkgehalt derselben mit 16% bemißt.

So ergibt sich also mit größter Sicherheit, daß der Kalk dem Knochen entstammt und die Phosphorsäure zwar mit dem retinierten Stickstoff angesetzt werden konnte, aber andererseits dafür in höherem Grade aus den Knochen entnommen wurde.

Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde nebst Bemerkungen über den Stoffwechsel der Phosphorsäure und der Magnesia.

III. Mitteilung.

Von

Martin Kochmann und Ernst Petzsch.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 28. Februar 1911.)

In den vorliegenden Versuchen sollen noch die Fragen erledigt werden, ob die Kohlenhydrate ähnlich auf den Kalkstoffwechsel einwirken wie Eiweiß und Fett, und ob auch ein schwer lösliches Kalksalz ein etwaiges Kalkdefizit decken kann.

Versuch 1.

Im folgenden Versuch wurde deshalb einem neuen Versuchstier zunächst wieder Pferdefleisch gegeben, dann zu dieser Nahrung, bei der ja eine negative Kalkbilanz zu erwarten stand, eine Kalkzulage gereicht. Dann wurde Traubenzucker zu der Nahrung zugelegt und eine Nachperiode ohne das Kohlenhydrat angeschlossen. Die Einzelheiten lassen sich aus den Tabellen entnehmen.

Tabelle I.

Zusammensetzung der Nahrung:

N 3,276% P_2O_5 0,4971% CaO 0,0127% MgO 0,0432%

Tabelle II.

Hund Nr. 3.

Nr. der Periode	Datum 1910	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Tägl. Futter u. Zulagen: Konservenfleisch g	destill. Wasser ccm	Traubenzucker g	CaO als Zulage g	Urin: währ. d. Periode ccm	Urin: täglich ccm	Kot: währ. d. Periode g	Kot: täglich g
1	20.—22. V.	3	9350	500	150	—	—	835	278	29	9,7
2	23.—27. V.	5	9190	500	150	—	—	1500	300	75	15,0
3	28.—31. V.	4	9135	500	150	—	—	1170	292,5	72	18,0
4	1.—5. VI.	5	9080	500	150	—	0,3	1400	280	115	23,0
5	6.—9. VI.	4	9000	500	150	18	0,3	1085	271,2	80	20,0
6	10.—14. VI.	5	8740	500	150	—	0,3	1475	295	67	13,4

Tabelle III. N-Stoffwechsel.

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung: durch Urin i. d. Periode g	durch Urin täglich g	durch Kot i. d. Periode g	durch Kot täglich g	Gesamtmenge i. d. Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i. d. Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
1	3	44,891	14,964	1,202	0,401	46,093	15,365	97,4	2,6	49,140	16,38	+ 3,047	+ 1,015
2	5	76,440	15,288	3,056	0,611	79,496	15,899	96,2	3,8	81,900	16,38	+ 2,404	+ 0,481
3	4	64,288	16,072	2,455	0,614	66,743	16,686	96,4	3,6	65,520	16,38	— 1,223	— 0,306
4	5	79,128	15,826	3,574	0,715	82,702	16,541	95,7	4,3	81,900	16,38	— 0,802	— 0,161
5	4	61,600	15,400	2,919	0,730	64,519	16,130	95,5	4,5	65,520	16,38	+ 1,001	+ 0,250
6	5	82,320	16,464	2,945	0,589	85,265	17,053	96,5	3,5	81,900	16,38	— 3,365	— 0,673

Tabelle IV. P_2O_5-Stoffwechsel.

1	3	6,119	2,040	0,728	0,243	6,847	2,283	89,4	10,6	7,457	2,486	+ 0,610	+ 0,203
2	5	11,725	2,345	1,265	0,253	12,990	2,598	90,3	9,7	12,435	2,487	— 0,555	— 0,111
3	4	9,975	2,494	0,922	0,230	10,897	2,724	91,6	8,4	9,942	2,486	— 0,955	— 0,238
4	5	10,845	2,169	2,253	0,451	13,098	2,620	82,8	17,2	12,435	2,487	— 0,663	— 0,133
5	4	8,360	2,090	1,697	0,424	10,057	2,514	83,1	16,9	9,942	2,486	— 0,115	— 0,029
6	5	10,946	2,189	1,631	0,326	12,577	2,515	87,0	13,0	12,435	2,487	— 0,142	— 0,028

Tabelle V. CaO-Stoffwechsel.

1	3	0,084	0,028	0,554	0,185	0,638	0,213	13,1	86,9	0,191	0,064	— 0,447	— 0,149
2	5	0,181	0,036	1,037	0,207	1,218	0,244	14,8	85,2	0,318	0,064	— 0,901	— 0,180
3	4	0,196	0,049	1,007	0,252	1,203	0,301	16,3	83,7	0,254	0,064	— 0,949	— 0,237
4	5	0,290	0,058	2,505	0,501	2,795	0,559	10,4	89,6	1,818	0,364	— 0,978	— 0,195
5	4	0,230	0,058	2,072	0,518	2,302	0,576	10,1	89,9	1,454	0,364	— 0,848	— 0,212
6	5	0,323	0,065	1,472	0,294	1,795	0,359	18,1	81,9	1,818	0,364	+ 0,023	+ 0,005

Tabelle VI. MgO-Stoffwechsel.

1	3	0,214	0,071	0,339	0,113	0,553	0,184	38,6	61,4	0,648	0,216	+ 0,095	+ 0,032
2	5	0,393	0,079	0,572	0,114	0,965	0,193	40,9	59,1	1,080	0,216	+ 0,115	+ 0,023
3	4	0,348	0,087	0,452	0,113	0,800	0,200	43,5	56,5	0,864	0,216	+ 0,064	+ 0,016
4	5	0,351	0,070	0,676	0,135	1,027	0,205	34,1	65,9	1,080	0,216	+ 0,053	+ 0,011
5	4	0,352	0,088	0,534	0,135	0,886	0,222	39,6	60,4	0,864	0,216	— 0,022	— 0,006
6	5	0,423	0,085	0,465	0,093	0,888	0,178	47,8	52,2	1,080	0,216	+ 0,192	+ 0,038

Die 3 ersten Perioden von 3, 5 und 4 Tagen zeigen nichts was nicht aus dem 1. Versuch schon bekannt gewesen wäre. Das Tier setzt in Periode I Stickstoff an und müßte demzufolge auch Phosphorsäure retinieren. Es tut dies auch, und zwar etwas mehr, als man nach dem Stickstoffansatz erwarten mußte. Worauf dies zurückzuführen ist, können wir nicht angeben. Doch möchten wir auf diese 1. Periode nur wenig Gewicht legen, da der Hund vor Beginn des Versuches erst 3 Tage vorher in den Käfig gesetzt worden war. Die Kalkbilanz ist, wie man erwarten durfte, negativ, die Magnesiabilanz zeigt dagegen einen positiven Wert.

Auch in der zweiten Periode ist die Stickstoffbilanz trotz Verlust an Körpergewicht eine positive, die Phosphorsäurebilanz ist aber negativ, und die negative Kalkbilanz ist noch höher geworden als vorher. Magnesia zeigt noch schwach positive Werte. In der 3. Periode ist die N-Bilanz auch negativ, und dementsprechend erreichen auch die negativen Zahlen der Phosphorsäure- und Kalkbilanz noch höhere Grade als vorher.

Die Werte für die Mengen der durch den Kot ausgeschiedenen Phosphorsäure und des Kalks sind ungefähr so beschaffen, daß diese Substanzen höchstwahrscheinlich zum weitaus größten Teil als Tricalciumphosphat durch den Kot ausgeschieden wurden.

Die Verteilung der durch den Harn und den Kot ausgeschiedenen N-, P_2O_5- und CaO- sowie MgO-Mengen zeigen nichts Bemerkenswertes und schwanken in diesen 3 Perioden nur unwesentlich.

In der 4. Periode bewirkt die Kalkzulage nur einen minimalen Rückgang in dem Kalkverlust um 42 mg, dem wir ohne die folgenden Perioden keinen Wert beilegen würden, der aber im Zusammenhang mit ihnen wohl dafür spricht, daß die Kalkzulage die Bilanz im günstigen Sinne beeinflußt. Im Verhältnis zwischen Kalk-, Phosphorsäure- und Stickstoff-Stoffwechsel sieht man auch hier wieder, daß der geringe negative Wert des Stickstoffs den höheren Phosphorsäureverlust nicht zu erklären vermag, der aber durch die zu Verlust gegangene Kalkmenge sofort plausibel wird.

In der Verteilung der durch Harn und Kot ausgeschiedenen P_2O_5- und CaO-Mengen sehen wir wieder, daß eine Verschiebung der Zahlen zuungunsten der Harnausscheidung eintritt.

In der nächsten Periode bedingt die Zulage von 18 g Traubenzucker eine Vergrößerung des Kalkverlustes. Es wird Stickstoff retiniert, und dadurch müßte auch 1 mg CaO angesetzt werden. Da tatsächlich 0,212 g verloren gehen, so ist die absolute CaO-Bilanz — 0,213 g.

Dieser Verlust ist scheinbar ein recht geringer, aber in der nächsten Periode, in der die Zuckerzulage fortfällt, wird die Kalkbilanz positiv, obwohl die Stickstoffbilanz ziemlich hohe negative Werte erreicht. Die absolute Kalkbilanz in der Nachperiode würde + 0,007 g CaO betragen. Man muß daher annehmen, daß die Zuckerzulage die Kalkbilanz ungünstig beeinflußt hatte.

Zweifellos läßt sich auch in den 3 letzten Perioden die Einwirkung des Kalkes wie des Stickstoffs auf die Phosphorsäurebilanz erkennen. Sonst ist in diesem Versuch nur noch die Tatsache bemerkenswert, daß der Kalk im Kot auch in den 3 letzten Perioden mit der Phosphorsäure offenbar in engen Beziehungen steht und zum größten Teil als Tricalciumphosphat ausgeschieden wird.

Des ferneren verdient auch die schon früher konstatierte Tatsache Erwähnung, daß in der Verteilung der Magnesia in Harn und Kot sofort eine Verschiebung zugunsten der Harnmagnesia auftritt, wenn der Kalkstoffwechsel in das Gleichgewicht kommt, wie auch gleichzeitig in diesem Versuch in der Kalkverteilung eine Änderung zugunsten des Harnkalks zu konstatieren ist.

Die Mengen des Harns und des Kotes bieten nichts Besonderes dar. Eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch die Mengenverhältnisse dieser Exkrete war nicht zu erkennen. Auch die diuretische Wirkung des Kalksalzes war hier nicht vorhanden.

Die Gesamtbilanzen zeigen in diesem Versuch folgendes Bild:

Tabelle VII.

	N g	P_2O_5 g	CaO g	MgO g
Einnahmen	425,880	64,646	5,853	5,616
Ausscheidung	424,818	66,466	9,951	5,119
Bilanz	+ 1,062	— 1,820	— 4,098	+ 0,497

Wir sehen also, daß der Versuchshund in den 26 Tagen ungefähr im Stickstoffgleichgewicht sich befand und nur unbedeutend N ansetzte.

Mit den retinierten 1,062 g N hätte er, wenn wir die früheren Überlegungen für die Berechnung zugrunde legen, 0,133 g P_2O_5 zurückhalten müssen.

Da er aber 1,820 g verliert, so muß er die Summe (1,820 + 0,133 g = 1,953 g) an einer anderen Stelle entnommen haben.

Auch hier zeigt uns die Kalkbilanz, daß diese Phosphorsäure wohl derselben Quelle wie der Kalk entstammt. Die Kalkbilanz erreicht einen negativen Wert von 4,098 g. Während in dem ersten Versuch unsere Rechnung ergab, daß etwas mehr Phosphorsäure oder vielleicht analoge Mengen den Knochen entnommen zu sein schienen als Kalkwerten entsprach, vorausgesetzt, daß diese beiden Substanzen als Tricalciumphosphat in Rechnung gesetzt wurden, so zeigt der letzte Versuch, daß im Verhältnis zum Kalk viel weniger Phosphorsäure ausgeschieden oder den Knochen entnommen wurde. Es ließe sich dies am besten dadurch erklären, daß durch die Kalkzulage in Gestalt des Calciumchlorids der Knochenkalk geschont wurde und das Kalkbedürfnis des Organismus, das er bei dieser Nahrung entfaltete, zum Teil durch die Kalkzulage befriedigt wurde.

Der Kalkverlust des Hundes ist auch in diesem Versuch ein recht erheblicher, denn das Tier schied, wenn wir den Kalkbestand des Tieres wieder zu 2% rechnen und mit ungefähr 180 g annehmen, 2,2% seines Gesamtkalkgehalts aus, ohne den Verlust durch die Einnahmen zu decken.

Versuch 2.

Der letzte Versuch, den wir angestellt haben, ist in mancher Hinsicht bemerkenswert. Zwar sind auch hier die äußeren Versuchsbedingungen dieselben geblieben wie früher. Aber das Tier war wesentlich kleiner als die vorigen Hunde. Es handelte sich außerdem um ein sehr lebhaftes Tier, das dauernd, häufig bellend, in seinem Käfig herumsprang und außerordentlich wachsam war.

An diesem Versuchstier sollte der Einfluß von Stärke auf den Kalkstoffwechsel untersucht werden. Ferner sollte das Kalk-

gleichgewicht nicht durch ein lösliches Kalksalz, sondern durch das schwerlösliche Tricalciumphosphat hergestellt werden.

Da der Stuhlgang in manchen Perioden, wenn auch nicht durchfällig, so doch etwas dünn war und mit dem abfließenden Urin so weit vermischt wurde, daß ein ganz sauberes, gesondertes Auffangen des Urins nicht möglich war, so mußte die Bestimmung des Kalks und der Magnesia sowie der Phosphorsäre im nach Neumann veraschten Urin vorgenommen werden. Zu der Phosphorsäurebestimmung wurden 5 ccm Urin verwandt und für die Analyse des Kalks und der Magnesia 200 ccm. Bezüglich der Phosphorsäurebestimmung ist nichts weiter zu bemerken, da sie in derselben Weise geschah wie früher im Kot. Für die Bestimmung des Kalks gingen wir so vor, daß wir das Säuregemisch mit Ammoniak neutralisierten und den Niederschlag oder die Trübung mit Salzsäure auflösten, das Eisen als Ferriphosphat durch Filtrieren entfernten und in dem Filtrat den Kalk in der beschriebenen Weise als oxalsauren Kalk fällten. Die Magnesiabestimmung geschah im Filtrat in der gewöhnlichen Weise.

Unter diesen Umständen war es nicht immer möglich, die Verteilung von Stickstoff usw. im Urin und Kot zu berechnen. Es muß noch erwähnt werden, daß in diesem Versuch die Bestimmung der zu untersuchenden Substanzen nicht im frischen Kot, sondern in der Trockensubstanz geschah. Die Einzelheiten sind aus den Zusammenstellungen ersichtlich.

Die Zusammensetzung der Nahrung des Hundes war folgende:

Tabelle VIII.

In 100 g Pferdefleisch sind vorhanden:

N 3,542 g P_2O_5 0,496 g CaO 0,0072 g MgO 0,0434 g

Tabelle IX.

Hund Nr. 4, männlich. Vor Beginn des Versuches 7 Tage im Käfig. 28. XI. 10: 5800 g; 30. XI. 10: 5500 g.

Nr. der Periode	Datum	Periode v. Tagen	Gewicht des Tieres	Tägl. Futter u. Zulagen				Urin		Kot				
				Konserv.-Fleisch	destill. Wasser	Fett oder Kohlenhydrat	CaO als Zugabe	i. d. Periode	täglich	währ. d. Periode			täglich	
										frisch	trocken	H_2O	frisch	trocken
			g	g	ccm			ccm	ccm	g	g	%	g	g
1	30.XI.—4.XII.	5	5300	250	200	—	—	1850	370	44	13	70,5	8,8	2,6
2	5.—9. XII.	5	5250	250	200	—	—	1560	312	88	21,5	75,6	17,6	4,3
3	10.—14. XII.	5	5100	400	200	—	—	1640	328	101,4	27,1	73,3	20,3	5,42
4	15.—19. XII.	5	5300	400	200	—	0,6 g	1350	270	69,6	25,0	64,1	13,92	5,0
5	20.—23. XII.	4	5275	400	200	—	0,6 g	1225	306	141,3	78,5	44,4	15,7	8,72
6	24.—28. XII.	5	5275	400	200	30 g Stärke	0,6 g	1645	329					
7	29.XII.—2.I.	5	5170	400	200	30 g Stärke	0,6 g	2040	408	174,6	66,2	62,1	34,9	13,24
8	3.—7. I.	5	5040	400	100	—	0,6 g	1835	367	65	30	53,8	13	6,0
9	8.—11. I.	4	5250	400	100	40 g Fett	0,6 g	1410	352,5	96,2	32	60,7	24,1	8,0

(CaO als Zugabe: $Ca_3(PO_4)_2$)

Tabelle X.

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung: durch Urin i. d. Periode g	durch Urin täglich g	durch Kot i. d. Periode g	durch Kot täglich g	Gesamtmenge i. d. Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i. d. Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
						N-Stoffwechsel.							
1	5	33,230	6,646	1,059	0,212	34,289	6,858	96,9	3,1	44,275	8,855	+ 9,985	+ 1,997
2	5	41,412	8,282	1,968	0,394	43,380	8,676	95,5	4,5	44,275	8,855	+ 0,894	+ 0,179
3	5	62,370	12,474	2,944	0,589	65.314	13,063	—	—	70,840	14,168	+ 5,526	+ 1,105
4	5	62,412	12,482	2,180	0,436	64,592	12,918	96,6	3,4	70,840	14,168	+ 6,247	+ 1,249
5	4	55,636	13,909	4,297	0,477	125,285	13,921	—	—	127,512	14,168	+ 2,227	+ 0,247
6	5	65 352	13,070					—					
7	5	66,696	13,339	4,940	0,988	71,636	14,327	—	—	70,840	14,168	− 0,796	− 0,159
8	5	67,536	13,507	2,415	0.483	69,951	13,990	96,5	3,5	70,840	14,168	+ 0,889	+ 0,178
9	4	53,004	13,251	2,460	0,615	55,464	13,866	—	—	56,672	14,168	+ 1,208	+ 0,302
						Tabelle XI. P_2O_5-Stoffwechsel.							
1	5	6,870	1,374	0,437	0,087	7,307	1,461	94,0	6,0	6,200	1,240	− 1,107	− 0,221
2	5	6,713	1,343	0.533	0,107	7,246	1,449	92,6	7,4	6,200	1,240	− 1,046	− 0,209
3	5	9,750	1,950	0,547	0,109	10,297	2,059	—	—	9,920	1,984	− 0,377	− 0,075
4	5	10,163	2,033	1,138	0,228	11,301	2,260	89,9	10,1	11.294	2,259	− 0,007	− 0,001
5	4	8,360	2,090	2,308	0,256	20,988	2,332	—	—	20,329	2,259	− 0,659	− 0,073
6	5	10,320	2,064										
7	5	10,260	2,052	1,589	0,318	11,849	2,370	—	—	11,294	2,259	− 0,555	− 0,111
8	5	10,088	2,018	1,758	0,352	11,846	2,369	85,2	14,8	11,294	2,259	− 0,552	− 0,110
9	4	7,875	1,969	1,510	0,377	9,385	2,346	—	—	9,035	2,259	− 0,350	− 0,088
						Tabelle XII. CaO-Stoffwechsel.							
1	5	0,136	0,027	0,573	0,115	0,709	0,142	19,2	80,8	0,090	0,018	− 0,619	− 0,124
2	5	0,142	0,028	0,569	0,114	0,711	0,142	20,0	80,0	0,090	0,018	− 0,621	− 0,124
3	5	0,398	0.080	0,467	0,093	0,865	0,173	—	—	0,144	0,029	− 0,721	− 0,144
4	5	0,307	0,061	1,298	0,260	1,605	0,321	19,1	80,9	1,770	0,354	+ 0,165	+ 0,033
5	4	0,334	0,084	1,957	0,217	2,628	0,292	—	—	3,186	0,354	+ 0,558	+ 0,062
6	5	0,336	0,067										
7	5	0,574	0,115	1,156	0,231	1,730	0,346	—	—	1,770	0,354	+ 0,040	+ 0,008
8	5	0,238	0,048	1,632	0,326	1,869	0,374	12,7	87,3	1,770	0,354	− 0,099	− 0,020
9	4	0,169	0,042	1,569	0,392	1,737	0,434	—	—	1,416	0,354	− 0,321	− 0,080
						Tabelle XIII. MgO-Stoffwechsel.							
1	5	0,277	0,055	0,278	0,056	0,555	0,111	49,9	50,1	0,543	0,109	− 0,003	− 0,001
2	5	0,240	0,048	0,292	0,058	0,532	0,106	45,1	54,9	0,543	0,109	+ 0,010	+ 0,002
3	5	0,255	0,051	0,274	0,055	0,529	0,106	—	—	0,868	0,174	+ 0,339	+ 0,068
4	5	0,342	0,068	0,450	0,090	0,792	0,158	43,2	56,8	0,868	0,174	+ 0,076	+ 0,015
5	4	0,307	0,077	0 691	0,077	1,370	0,152	—	—	1,562	0,174	+ 0,193	+ 0,021
6	5	0,372	0,074										
7	5	0,515	0,103	0,444	0,089	0,958	0,192	—	—	0,868	0,174	− 0,090	− 0,018
8	5	0,314	0,063	0,560	0,112	0,873	0,175	35,9	64,1	0,868	0,174	− 0,005	− 0,001
9	4	0,255	0,064	0,592	0,148	0,847	0,212	—	—	0,694	0,174	− 0,153	− 0,038

Wir wollen es uns versagen, diesen Versuch so ausführlich zu besprechen wie die früheren. Es soll hier genügen, die wichtigsten Punkte hervorzuheben. Im allgemeinen bestätigt auch dieser Versuch die Er-

gebnisse der früheren. Wir sehen in den Perioden 1 und 2, daß das Tier bei einer Nahrung von 250 g Konservenfleisch mehr Kalk ausscheidet als es eingenommen hat, und zwar ist es besonders bemerkenswert, daß die tägliche Kalkausscheidung während dieser 10 Tage vollkommen unverändert geblieben ist. Die tägliche negative Bilanz beträgt — 0,124 g. Dabei ist eine erhebliche Vermehrung der Trockensubstanz des Kotes von 2,6 g auf 4,3 g täglich eingetreten. Von einer Abhängigkeit der Kalkausscheidung vor der Menge des Kotes kann also nicht die Rede sein. Aber auch die Menge des durch den Kot wieder ausgeschiedenen Stickstoffs ist in diesen beiden Perioden ohne Einfluß auf die Kalkbilanz; denn in der zweiten Periode ist die Stickstoffausscheidung durch den Kot größer als in der ersten. Eine Änderung der Kalkbilanz hat aber nicht stattgefunden, ebensowenig wie eine Verschiebung der Ausscheidung durch Urin und Kot. Auffallend ist die negative Bilanz der Phosphorsäure und die Gleichheit der Werte in beiden Perioden. Daraus ist zu entnehmen, daß die Stickstoffbilanz hier keinen Einfluß auf die der Phosphorsäure ausgeübt hat. Nach den üblichen Anschauungen würde also ein Ansatz des Stickstoffs, besonders in der 1. Periode, unwahrscheinlich sein.

Durch die Futterzulage von 150 g Fleisch täglich in der Periode 3 kommt es wieder zu vermehrter N-Retention und wie früher zu einer vermehrten CaO-Ausscheidung, so daß die Kalkbilanz trotz vermehrter Zufuhr stärker negativ wird als vorher.

In der nächsten Periode 4 bedingt die Zulage von Tricalciumphosphat eine positive CaO-Bilanz, die aber kleiner ist als man annehmen mußte, da der Unterschied gegen die Bilanz in Periode 3 0,177 g CaO beträgt, die Mehreinnahme jedoch 0,325 g CaO.

In Periode 5 und 6 sind die Kote beider Perioden miteinander vermischt worden, so daß leider der Einfluß der in der 6. Periode gegebenen Stärke nicht zum Vorschein kommen konnte, wenn er überhaupt vorhanden war. Die Kalkbilanz bessert sich weiter, doch ist es eben nicht ersichtlich, welchen Anteil Periode 5 und 6 daran haben.

In Periode 7 werden ebenfalls beim sonst gleichen Futter 30 g Stärke zugegeben, die Kalkbilanz sinkt herab, wenn sie auch noch positiv bleibt. Es erscheint uns aber fraglich, ob man diese Tatsache mit der Stärkezulage in Zusammenhang bringen kann, denn in der Periode 8 fällt die Stärkezulage fort und die CaO-Bilanz wird sogar negativ; dies aber auf eine Nachwirkung der Stärke zu beziehen, dürfte bei der Länge der Perioden nicht angängig sein.[1]) Aus diesen beiden Perioden sieht man wieder deutlich, daß die Menge des Kotes keinen Einfluß auf die Kalkbilanz ausübt; denn in Periode 8 mit der negativen Bilanz ist die Menge des trockenen Kotes 6,0 g, während in Periode 7 mit positiver Bilanz die Kotmenge 13,24 g beträgt.

[1]) Die Stärke wurde vielleicht in unzweckmäßiger Form, nämlich roh in nicht gekochtem Zustande mit dem Fleisch vermischt, dem Hunde gereicht.

In der letzten Periode wird dem Tiere eine Fettzulage gegeben, und wir sehen infolgedessen, daß die Kalkbilanz auf — 0,080 g heruntergeht. Aber wir müssen hervorheben, daß die Verschlechterung der Bilanz hinter unseren Erwartungen zurückbleibt. Sie war in einem früheren Versuch durch die Fettzulage viel erheblicher. Auch die Magnesiabilanz wird durch die Fettzulage offenbar ebenfalls im ungünstigen Sinne beeinflußt.

Die Phosphorsäurebilanz dieses Versuchs zeigt ein weniger prägnantes Bild als in den früheren Versuchen. Auffallend sind die dauernd negativen Bilanzen, die bestehen bleiben, obwohl doch zeitweise die Kalkbilanzen positiv sind, die Zahlen des Stickstoffs manchmal starke Retention zeigen und durch den phosphorsauren Kalk, der als Zulage gereicht wird, Phosphorsäure zugeführt wird. Wie diese Tatsache zu erklären ist, können wir nicht angeben. Jedenfalls handelt es sich nicht um analytische Fehler, da wir sowohl nach der Uranmethode als auch nach Neumann, schön übereinstimmende Werte für die Urinphosphorsäure bekamen.

Die Zahlen der Phosphorsäure- und Kalkausscheidung durch den Kot sprechen, soweit sie sich berechnen lassen, auch wieder dafür, daß beide Substanzen als phosphorsaurer Kalk ausgeschieden werden.

Ob die Zulage von phosphorsaurem Kalk resorbiert wurde, darauf geben schon die Veränderungen der CaO-Bilanzen deutliche Antwort. Die Kalkbilanz hätte nicht positiv werden können, wenn nicht die Zulage resorbiert worden wäre. Aber daß sie vollkommen resorbiert wurde, läßt sich nicht feststellen.

Wie auch in den früheren Perioden können wir über das Verhalten des Magnesiaumsatzes etwas Bestimmtes nicht sagen. Die Bilanzzahlen weisen im allgemeinen zu geringe Unterschiede auf, als daß man bestimmte Schlüsse zu ziehen berechtigt wäre. Nur in Periode 3 und 9 sind die Differenzen etwas größer. Im ersten Falle scheint die vermehrte Zufuhr eine Retention von MgO zu bedingen, und im letzteren könnte vielleicht die Fettzulage den geringen MgO-Verlust herbeiführen. Jedenfalls geht aus diesem Versuch die Tatsache hervor, daß der phosphorsaure Kalk resorbiert werden kann, und daß die Kalkverluste nach Zulage von Fleisch und Fett nicht mit der Menge der Kottrockensubstanz oder des Kotstickstoffs in Zusammenhang gebracht werden können.

Auf einen Umstand muß aber noch besonders die Aufmerksamkeit gelenkt werden: Die Kalkverluste, die wir in diesem Versuch durch Zulage von Fleisch oder von Fett erhalten haben, sind nicht so groß wie in dem früheren Versuch der II. Mitteilung, den wir allein mit diesem letzten vergleichen können. Die Vergrößerung der negativen Bilanz nach Vermehrung des Fleisches in der Nahrung kann zwar nicht so erheblich sein als in diesem Versuch; denn dort wird die Fleischmenge auf das Doppelte gesteigert, während hier die Fleischmenge durch die Zulage nur auf das 1,6fache steigt. Aber der Kalkverlust durch die 40 g Fettzulage ist viel geringer als bei Hund Nr. 1, wenn sie auch deutlich vorhanden ist.

Wir sehen also, daß sich die Tiere quantitativ bezüglich der Beeinflussung des Kalkstoffwechsels durch die organischen Nahrungskomponenten keineswegs gleichartig verhalten. Ein Weg, diese Unterschiede aufzuklären, schien uns durch die Ausführungen Hohmeiers[1]) gegeben, der sich dabei auf die Erfahrungen Röpkes stützte. Bei Kindern mit Verkrümmungen der Gliedmaßen auf rachitischer Grundlage ist es möglich, durch vollkommene Ruhigstellung die schon ganz festen, unnachgiebigen Knochen wieder weich und biegsam, gleichsam modellierbar zu machen. Es liegt klar auf der Hand, daß dies nur durch eine Entkalkung des Knochens möglich ist. Vielleicht haben ähnliche Momente bei unseren Versuchstieren gleichfalls mitgespielt. Die ersten Hunde waren große Tiere von 10,300 und 9,300 kg Körpergewicht und ruhigem Temperament, die sich wohl gut in ihren Käfigen bewegen konnten, aber zu Sprüngen und fortwährendem Umherlaufen im Käfig keine Neigung und keinen Platz hatten. Das kleine Tier Nr. 3 wog nur 5,300 kg, war, wie schon oben hervorgehoben wurde, äußerst lebhaft, sprang eigentlich dauernd in seinem Käfig laut bellend und heulend umher und konnte sich bei Annäherung von Fremden kaum beruhigen. Wir glauben nun, daß besonders bei dem Hunde Nr. 1 die geringe Bewegung ein unterstützendes Moment gewesen ist, um die Wirkung der organischen Nahrungskomponenten in verstärktem Maße zum Vorschein kommen zu lassen, während bei dem letzten Hund die lebhafte Bewegung diesem Einfluß entgegenwirkte. Es wird der Gegenstand späterer Untersuchungen sein müssen, den Einfluß der Bewegung und Ruhe auf den Kalkstoffwechsel experimentell zu prüfen.

Vielleicht liegt es an diesen Umständen, daß bei Stoffwechselversuchen am erwachsenen Menschen diese Beeinflussung des Kalkstoffwechsels nicht in erheblichem Maße zutage getreten ist. Wenn man allerdings die Versuche am Menschen von dem Gesichtspunkt unserer Untersuchungen aus betrachtet, so hat es den Anschein, als ob manches dafür spräche, daß sie einen ähnlichen Erfolg haben könnten. Wenn wir beispielsweise die Ergebnisse der Selbstversuche Renvalls und Bertrams miteinander vergleichen, so sehen wir, daß folgende Verhältnisse auftreten.

Tabelle XIV.

Versuch	Kalkbedürfnis g	Eiweiß g	Kohlenhydrate g	Fett g
Bertram	0,4	102	90,0	101,6
Renvall, 31. X. . .	1,3	82,0	149,6	213,0
„ 18. XI. . .	2,1	132,6	326,3	182,0

Renvall bezieht das größere Kalkbedürfnis auf die schlechtere Ausnutzung des Nahrungskalkes, da der Kalk in der Tat in der Versuchsperiode vom 18. XI. in anderer Form aufgenommen wird.

[1]) Hohmeier, Sitzung d. med. Ges. Greifswald, Januar 1911.

Auf manche Punkte unserer gesamten Versuchsergebnisse müssen wir noch mit einigen Worten eingehen. Wir sahen, daß bei kalkarmem Futter die Kalkbilanz immer negativ bleibt, so daß wir die Ergebnisse Dibbelts (l. c.), es fände eine allmähliche Anpassung an die kalkarme Nahrung statt, in keinem unserer Versuche bestätigen können. Des weiteren stellten wir fest, daß die Vermehrung der Fleischmengen eine Mehrausscheidung von Kalk bedingt. Es konnte aber gleichzeitig bewiesen werden, daß weder die Menge des Kotes, noch seine Trockensubstanz, noch endlich sein Stickstoffgehalt in irgend einem Zusammenhang mit den ausgeschiedenen Kalkmengen steht. Da mit der Erhöhung der Fleischmenge nicht nur die eingeführte Eiweißmenge, sondern auch die der Salze vergrößert wird, so könnten diese beiden Bestandteile der Nahrung die Kalkbilanz beeinflussen. Wir halten es dagegen für ausgeschlossen, daß die minimalen Mengen von Fett und Glykogen eine Wirkung ausgeübt hätten. Nun hat Rüdel[1]) sowohl bei Kindern wie bei Hunden gezeigt, daß nach Eingabe von phosphorsaurem Natron, in allerdings sehr hohen Gaben die Menge des Urinkalks zurückgeht, wodurch aber noch keineswegs bewiesen wurde, daß der eingenommene Kalk nicht resorbiert und die Kalkbilanz ungünstig beeinflußt wurde, da eine gleichzeitige Untersuchung des Kotkalks nicht stattfand. Wenn auch phosphorsaure Alkalien im Muskelfleisch die Hauptmenge der Salze darstellen, so haben sie doch nicht einmal den von Rüdel gezeigten Einfluß ausüben können, weil sie wahrscheinlich in noch nicht wirksamen Gaben eingeführt wurden, denn wir sehen im Gegenteil, daß nach Vermehrung der Fleischkost und damit der im Fleisch enthaltenen Salze der Urinkalk ansteigt.

Da auch die Stickstoffmenge des Kotes, die zum Teil als Maß für die Sekretionstätigkeit des Darmes angesehen wird, bei der Mehrausscheidung des Kalkes nicht vergrößert ist, so ist es wohl auch kaum möglich, der Nahrung als solcher eine direkte oder reflektorische Wirkung auf die Absonderung des Kalks im Darm zuzuschreiben. Per exclusionem kommen wir also zu dem Schluß, daß der Eiweißgehalt des Pferdefleisches bzw. die Vermehrung desselben die negative Kalkbilanz bedingt und vergrößert.

[1]) G. Rüdel, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 33, 79, 1894.

Eine ganz andere Frage ist die, wie man sich den ungünstigen Einfluß des Nahrungseiweißes zu erklären hat. Eine direkte Einwirkung auf den Darm ist unmöglich, da bei unseren normalen, erwachsenen Hunden, die nur alle 2 bis 3 Tage einmal den Kot absetzten, das Nahrungseiweiß als solches überhaupt gar nicht in den Dickdarm, die Sekretionsstätte des Kalkes gelangt. Eine reflektorische Einwirkung erscheint kaum denkbar; denn sonst müßte auf eine Eiweißzulage die vermehrte Kalkausscheidung manchmal schon in der vorhergehenden Periode bemerkbar sein, da ja auf die reflektorische Reizung des Magens oder des Dünndarms hin der Dickdarm in den Kot der vorhergehenden Periode hinein sezernieren müßte. Ob die Eiweißzulage bei unseren Hunden zur Bildung von Fettseifen geführt oder deren Entstehen begünstigt hat, erscheint uns ziemlich ausgeschlossen;[1]) denn die Beschaffenheit des Stuhles war gegen früher nicht im geringsten geändert, außerdem ist die Fettmenge des Fleisches eine minimale, und die Sekretion des Darmes kann nach den Stickstoffwerten keine Rolle dabei spielen. Immerhin könnte diese Frage noch durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Wir sind jedenfalls geneigt, auf Grund dieser Sachlage die Schädigung des Kalkstoffwechsels nicht in den Darm, sondern in die Stätten der Stoffwechselvorgänge, vielleicht in den intermediären Stoffwechsel, zu verlegen.

Da die Zulage von Kohlenhydraten (Zucker) und besonders von Fett die Kalkausscheidung gleichfalls in mehr oder weniger hohem Grade vermehrt, so müssen wir uns auch hier die gleichen Fragen vorlegen, die wir auch in ähnlichem Sinne beantworten können. Daß die Zulage von Fett die Entstehung von Fettseifen (Kalkseifen) begünstigt oder bedingt, ist natürlich von vornherein in hohem Grade wahrscheinlich, aber sie dürfte doch nur in geringem Umfange für die Mehrausscheidung des Kalks verantwortlich zu machen sein. Wäre es nur die Aufgabe des in den Darm ausgeschiedenen Kalks, die entstandenen Fettsäuren zu neutralisieren, so wäre die gleichzeitig auftretende Mehrausscheidung von Phosphorsäure unverständlich.[2]) Die

[1]) Für den Säugling nimmt Freund (Ergeb. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 3, 139) an, daß Eiweißzulagen (Casein) die Seifenbildung zu begünstigen vermögen.

[2]) Uns ist wohl bekannt, daß W. Freund beim Säugling andere Ergebnisse erzielt hat.

Mehrausscheidung geht aber deutlich aus unseren Versuchen hervor. In manchen Perioden scheint sogar die gesamte Kalkmenge des Kotes genügend Phosphorsäure zur Verfügung zu haben, so daß die Bindung zu Tricalciumphosphat möglich ist. Und selbst die Fettzulage ändert im Verhältnis der Kalkmengen des Kotes zur Menge der Kotphosphorsäure nichts, wie aus der kurzen Aufstellung der Quotienten $P_2O_5 : CaO$ im Kot des Versuchstieres Nr. 1 (II. Mitteilung) hervorgeht.

Tabelle XV.

Periode Nr.	P_2O_5 im Kot	CaO im Kot	Verhältnis $P_2O_5 : CaO$
12	0,580	1,072	1:1,848
13	0,631	1,056	1:1,674
14	1,133	1,936	1:1,702
15	1,320	1,858	1:1,408

Die Einführung von 50 g Fett bedingt also keine Veränderung des Quotienten in Periode 14 und 15. Dies kommt aber nur dadurch zustande, daß einerseits die Phosphorsäureausscheidung mehr in den Darm verlegt wird, die P_2O_5 also in den Kot abgelenkt wird, ohne daß die Bilanz gestört ist; andererseits wird der genannte Quotient dadurch unverändert erhalten, daß die Phosphorsäure geradezu in größeren Mengen abgeschieden wird, der Kalk also sicher als phosphorsaurer Kalk dem Körper entnommen und eliminiert wird. Man kann mithin selbst in den Perioden erheblicher Fettzulage eine die Kalkausscheidung in erheblichem Maße beeinflussende Fettsäurebildung nicht annehmen.

Wir glauben infolgedessen, daß bei unseren gesunden, erwachsenen Hunden die schädliche Beeinflussung des Kalkstoffwechsels, selbst durch die Fettzulagen, nicht im Darm, sondern im Betriebe der Stoffwechselvorgänge stattfindet.

Die Bedeutung des Kalks bei diesen Prozessen können wir uns vielleicht in der Weise vorstellen, daß diesem Mineralstoff die Aufgabe zufällt, giftige Stoffwechselprodukte, Schlacken und Abfälle, zu entgiften, unschädlich zu machen.

Ob es sich dabei um eine einfache Neutralisation von Säuren handelt oder ob noch andere Mechanismen eine Rolle dabei spielen, ist vorderhand nicht zu entscheiden. Daß dem Kalk aber im organischen Leben häufig die Rolle des Entgifters

zukommt, geht aus vielfachen Versuchen hervor. Es sei da nur an die Unternehmungen J. Loebs[1]) erinnert, an die Meltzers[2]), der die antagonistische Wirkung von Kalk und Magnesia zeigen konnte, und die der Schüler H. Meyers[3]), nach denen die Wirkung der Oxalsäure durch Kalk paralysiert werden kann.

Der für diese Zwecke nötige Kalk wird bei unseren Hunden dem Skelettsystem entnommen, das innerhalb kurzer Zeit große Mengen dieses Mineralstoffs abzugeben imstande ist, ohne krankhafte Veränderungen aufzuweisen. Die Magnesia geht in unseren Versuchen ganz andere Wege wie der Kalk, nur in manchen Versuchsperioden hat es den Anschein, als ob sie in ganz minimalem Grade den Kalk zu ersetzen imstande wäre, ohne daß ihre Bilanz in Mitleidenschaft gezogen würde.

Die Ergebnisse dieser Versuche, die wir am gesunden, ausgewachsenen Hunde unter den geschilderten Versuchsbedingungen angestellt haben, sind folgende:

1. Es ist nicht möglich, eine bestimmte minimale Kalkmenge als für die Erhaltung des Kalkgleichgewichts nötig aufzustellen.

2. Die dazu erforderliche Kalkmenge ist je nach der Art und Menge der Nahrung verschieden und muß für jede Nahrung besonders bestimmt werden.

3. Eiweiß, Kohlenhydrate und Fett beeinflussen die Kalkbilanz in der Weise, daß eine Zulage dieser Nahrungskomponenten zu der ursprünglichen Nahrung das vorher bestehende Kalkgleichgewicht stört und der Organismus erhebliche Kalkmengen abgibt.

4. Es hat den Anschein, als ob sehr stark eingeschränkte körperliche Bewegung als unterstützendes Moment dafür in Frage kommt.

5. Die zu Verlust gehenden Kalkmengen werden als phosphorsaures Salz dem Kalkvorrat des Skelettsystems entnommen, dessen Kalkgehalt offenbar in ziemlich weiten Grenzen Schwankungen aufweisen kann, ohne krankhafte Veränderungen zu zeitigen.

---

[1]) Vgl. dazu die schönen Ausführungen J. L. Meyers, Jahrb. f. Kinderheilk. 71, 1, 1910.

[2]) S. J. Meltzer und J. Auer, Amer. Journ. of Physiol. 21, 444, 1908.

[3]) H. H. Meyer, Münch. med. Wochenschr. 1910, 2267.

6. Diese Vorgänge, die nach außen hin als Schädigung des Kalkstoffwechsels imponieren, sind wir geneigt, als Mechanismen der Abwehr und des Schutzes gegen toxische Stoffwechselschlacken aufzufassen, und glauben auch die Ansicht rechtfertigen zu können, daß diese Dinge sich vorzugsweise im Getriebe des Stoffwechsels, vielleicht im intermediären Stoffwechsel, und nur zu einem kleinen Teil im Darm abspielen.

7. Sowohl durch lösliche wie durch unlösliche Kalksalze, die dem Futter beigegeben werden, läßt sich das gestörte Gleichgewicht wieder herstellen und Kalk sogar zum Ansatz bringen, jedoch muß die Kalkzulage größer sein als das Defizit, selbst wenn nur Stoffwechselgleichgewicht hergestellt werden soll. Die retinierten Kalkmengen können zum Teil wenigstens als phosphorsaurer Kalk zum Ansatz gelangen, auch wenn beispielsweise das Chlorid eingeführt wurde.

8. Der Kalkstoffwechsel wird also durch die verschiedensten Faktoren beeinflußt, von denen die Art und Menge der organischen Nahrungskomponenten, die Bewegung oder Ruhe des Tieres, der eigene Kalkvorrat und die Menge des Nahrungskalks die wichtigsten sein mögen.

9. Die löslichen Kalksalze können, was bekannt ist, eine diuretische Wirkung entfalten.

10. Die Vermehrung der Diurese durch Erhöhung der Wasserration bringt keinerlei Veränderungen im Kalkstoffwechsel hervor.

11. Der Phosphorsäurestoffwechsel wird sowohl durch den des Kalks wie durch den des Stickstoffs beeinflußt. Doch sind außer diesen Faktoren und den in der Nahrung vorhandenen Mengen noch andere für den Phosphorsäurestoffwechsel bedeutungsvoll.

12. Der Magnesiastoffwechsel hat in unseren Versuchen kein charakteristisches Aussehen. Doch kann dies an der Anlage der Versuche liegen. Man gewinnt höchstens die Anschauung, daß unter besonderen Umständen die Magnesia den Kalk in seiner Tätigkeit unterstützen und bis zu einem gewissen Grade vertreten könnte.

13. Die Verteilung von Stickstoff, Phosphorsäure, Kalk und Magnesia zwischen Urin- und Kotausscheidung schwankt in den Versuchen in weiten Grenzen. Die Unterschiede in der

Ausscheidung des Stickstoffs durch den Kot betragen 2,6 bis 8,8% (Gesamtausscheidung mit 100% in Rechnung gesetzt), der Phosphorsäure 6,0 bis 43,3%, des Kalks 80,0 bis 95,3%, der Magnesia 43,7 bis 88,9%.

Zum Schluß möchten wir hervorheben, daß wir den Wert unserer experimentellen Untersuchungen nicht etwa darin sehen, daß hier beim erwachsenen normalen Organismus — was übrigens noch nicht bekannt war — analoge Verhältnisse konstatiert wurden, wie beim magen-darmkranken und vielleicht auch gesunden Säugling, sondern vielmehr darin, daß wir Mittel und Wege haben, bei Tieren durch diätetische Maßregeln willkürlich Stoffwechselstörungen hervorzurufen, die in mancher Beziehung Erkrankungen des Menschen ähneln könnten. Auf diese Weise verfügen wir über Tiere mit Stoffwechselvorgängen, die von der Norm abweichen und dann der experimentellen Therapie zugänglich gemacht werden können. Die Anwendung der löslichen und schwer löslichen Kalksalze, die wir in unseren Versuchen darreichten, sollte ein Schritt in dieser Richtung sein und auf die Möglichkeit ihrer therapeutischen Verwendung hinweisen.

Beiträge zur Frage der Glykolyse.

II. Mitteilung.

Die Bedeutung der Phosphate für die oxydative Glykolyse.

Von

Walther Löb.

(Aus der chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 4. März 1911.)

In meiner ersten Mitteilung über die Frage der Glykolyse[1]) habe ich bereits darauf hingewiesen, daß die Versuche von Michaelis und Rona[2]) zur Beurteilung der Alkaliempfindlichkeit des Traubenzuckers im lebenden Organismus einer Ergänzung bedürfen. Die Glykolyse ist im allgemeinen ein Oxydationsvorgang. Ihre Nachahmung im Reagensglase bedarf daher der Gegenwart von Sauerstoff. Michaelis und Rona haben ihre Versuche zur Prüfung der Behauptung von Bendix und Bickel[3]), daß Traubenzucker in reinen, wässerigen, verdünnten Sodalösungen bei Bruttemperatur in erheblichen Mengen zerstört werde, angestellt und sich gegen die Versuchsanordnung der genannten Forscher gewandt; sie haben aber ebenso wenig wie Bendix und Bickel die notwendige Gegenwart des Sauerstoffes in Betracht gezogen.

Berücksichtigt man die Rolle des Sauerstoffs, so wird das Resultat ein anderes als das von Michaelis und Rona erhaltene. Die Alkalescenz des Blutes ist unter besonderen Umständen befähigt, in den für glykolytische Versuche in Betracht kommenden Zeiten erhebliche Zuckerzerstörungen zu veranlassen.

---

[1]) Diese Zeitschr. 29, 317, 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 23, 364, 1910.

[3]) Deutsche med. Wochenschr. 1902, 3.

Diese besonderen Umstände zeigten sich, als ich, den Vorschlägen von Sörensen[1]) und Michaelis[2]) folgend, die Hydroxylionenkonzentration durch Phosphatgemische regelte. Bei einem Wasserstoffionenexponenten,[3]) dessen Wert der Blutalkalescenz entsprach, fand starke Glykolyse statt. Die Annahme lag nahe, daß die Phosphationen hierbei nicht unbeteiligt sind; wir wissen aus den Untersuchungen von Harden und Young[4]), von Buchner und Antoni[5]) u. a., daß sowohl organische Phosphorverbindungen, wie phosphorsaure Salze bei der alkoholischen Gärung eine beschleunigende Wirkung auszuüben vermögen. Es erscheint deshalb nicht ausgeschlossen, daß auch bei der vollständigen Zuckerzerstörung phosphorhaltige Bestandteile eine wesentliche Rolle spielen, die, wie aus den Gärungsversuchen geschlossen werden kann, sich auf die eine Glykolyse vorbereitenden Spaltungsvorgänge bezieht.

Daß es sich bei der oxydativen Glykolyse in Gegenwart von Phosphationen um eine Hydroxylionenreaktion handelt, geht aus den Versuchen mit Phosphatgemischen hervor, in denen eine wesentlich höhere Wasserstoffionenkonzentration, als der Blutalkalescenz entsprach, herrschte. Hier blieb eine Zuckerzerstörung nahezu aus; es handelt sich demnach, wie an Hand der Versuche noch näher erörtert wird, um eine durch Phosphationen verstärkte Wirkung der Hydroxylionen, wobei zunächst die Frage offen bleiben soll, ob die Phosphationen lediglich als Katalysatoren der Hydroxylionen anzusehen sind. Für die biologische Fragestellung ist die Anwendung des Phosphatgemisches geeignet, weil im Blut und in den Geweben mit analogen Wirkungen phosphorhaltiger Substanzen gerechnet werden darf. Gerade weil innerhalb des Organismus die Ionenkonzentrationen nicht einfach durch Alkalien und Säuren, sondern durch Salzgemische reguliert werden, bieten die von Michaelis und Sörensen vorgeschlagenen Reaktionsregulatoren für Enzymversuche die Gefahr, nicht indifferente Ionen in die

---

[1]) Diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

[2]) Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden. Herausgegeben von Abderhalden, 8, 1344, 1910.

[3]) Vgl. Sörensen, diese Zeitschr. 21, 159, 1909.

[4]) Proc. Chem. Soc. 21, 189, 1905.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 136, 1905.

Versuchslösung zu bringen. Nach den in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnissen wird man stets die Frage nach der spezifischen Wirkung der Reaktionsregulatoren auf Enzymwirkungen experimentell entscheiden müssen. Zweifellos verdankt das Blut, dessen Wasserstoff- und Hydroxylionenkonzentration nahezu die des reinen Wassers ist, seine Wirksamkeit als Reaktionsmedium Stoffen, die, ohne die Ionenkonzentrationsverhältnisse selbst sehr zu verschieben, die Wirkung dieser Ionen stark beeinflussen. So bleibt auch in den vorliegenden Versuchen in Wasser die Zuckerzerstörung unter denselben Bedingungen nahezu aus, die sie in Phosphatgemischen reichlich herbeiführen, obgleich die Hydroxylionenkonzentration in beiden Fällen nur unerheblich differiert.

Die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes ist rund $0{,}3 \times 10^{-7}$, $p_{H\cdot} = 7{,}52$, die des reinen Wassers nach Sörensens neuesten Messungen $0{,}85 \times 10^{-7}$, $p_{H\cdot} = 7{,}07$.

Nimmt man für das Produkt $C_{H\cdot} \times C_{OH'}$ den recht genau bestimmten Wert $0{,}72 = 10^{-14}$, $p_{H\cdot} p_{OH'} = 14{,}143$, so folgt für die OH'-Konzentration des Blutes $2{,}4 \times 10^{-7}$, $p_{OH'} = 6{,}620$. Diese Daten stimmen sämtlich gut mit denjenigen überein, die ich mit Higuchi[1]) nach der elektrometrischen Methode für normales kohlensäurefreies Placentarserum ermittelt habe. $C_{H\cdot} = 0{,}23 \times 10^{-7}$, $p_{H\cdot} = 7{,}64$; $C_{OH'} = 3{,}13 \times 10^{-7}$, $p_{OH'} = 6{,}50$. Man darf also durch die innerhalb dieser Grenzen liegende Ionenkonzentration die Alkalescenz des normalen Blutes als gut definiert ansehen. Bei mittlerer Kohlensäurespannung im Blute wird $C_{H\cdot} = 0{,}3$ bis $0{,}35 \times 10^{-7}$, $p_{H\cdot} = 7{,}52 - 7{,}46$ dem wahren Werte sehr nahe liegen.

Experimenteller Teil.

Alle Versuche sind bei 37° durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug 24 Stunden oder ein Vielfaches dieser Zeit. Die Phosphatmischungen wurden nach dem Vorschlage von Michaelis durch Mischen von $^1/_2$ n-primären und $^1/_2$ n-sekundären Natriumphosphatlösungen hergestellt. Die für die Blutalkalescenz bei 37° gewählte Mischung: $\frac{1 \text{ primäres Phosphat}}{6{,}9 \text{ sekundäres Phosphat}}$ reagiert gegen Phenolphthalein noch sauer, während sie gegen Lackmus bereits deutlich alkalisch wirkt. Die in den Tabellen nach Abschluß der Versuche angeführte „Reaktion" bezieht sich auf das Ver-

---

[1]) Diese Zeitschr. 24, 92, 1910.

halten gegenüber Lackmuspapier. Die Glykolyse ist stets mit einer starken Säurebildung verknüpft. Die bei der Glykolyse entstehenden Produkte werden in einer besonderen Arbeit demnächst ausführlich beschrieben werden.

Die Verschiebung der Ionenkonzentrationen nach der Seite einer Verarmung an OH' durch den Prozeß der Glykolyse bedeutet eine Hemmung der Glykolyse, die für den Organismus fortfallen würde, da im Blute eine dauernde Regulierung der Ionenkonzentrationen stattfindet, die im Reagensglase natürlich fehlt. Als Oxydationsmittel wurde ausschließlich 3%iges, aus neutralem „Perhydrol Merck" dargestelltes Wasserstoffperoxyd von vollkommen neutraler Reaktion benutzt. Die Konzentration dieser Lösungen nimmt im Laufe der Zeit durch Selbstzersetzung etwas ab, so daß eine Verstärkung der Wasserstoffperoxydkonzentration erforderlich wird. Es wurde ausschließlich mit reinstem Traubenzucker gearbeitet.

Die Zuckerbestimmung erfolgte sowohl durch Polarisation wie durch die Titration nach der von Bang angegebenen Methode. Die letztere wird, wie besondere Versuche ergaben, durch den geringen Gehalt an häufig noch vorhandenem Wasserstoffperoxyd nicht beeinträchtigt, so daß die anfangs gewählte Zersetzung des letzteren durch Platinschwamm vor dem Zusatz der Kupferlösung später fortgelassen werden konnte.

Zur Ausführung der Analyse wurden je nach der Konzentration der Zuckerlösung 10 oder 20 ccm der Versuchslösung mit Wasser auf 100 ccm oder in Gegenwart von Eiweißsubstanzen mit 70 ccm kolloidaler Eisenoxydlösung, 10 ccm 10%iger Magnesiumsulfatlösung und Wasser auf 100 ccm gebracht. In den letzteren Fällen erfolgt die Mischung der Lösungen zweckmäßig in einer Porzellanschale, in der ein inniges Verrühren leicht von statten geht; der Eiweiß-Eisenhydroxydbrei wird dann durch ein Koliertuch mit trockner Hand abgepreßt und das Kolat filtriert. Das Filtrat ist wasserklar und eiweißfrei.

Die auf 100 ccm gebrachten Lösungen wurden nun in einem 18,94 cm langen Rohr, für das die abgelesene Drehung in Graden bzw. ihren Bruchteilen sogleich den Zuckergehalt in Prozenten angibt, polarisiert. Zur Titration gelangten je 10 ccm der auf 100 ccm verdünnten Lösungen, die mit 50 ccm Bang-

scher Kupferlösung 3 Minuten gekocht und nach schnellem Abkühlen mit Hydroxylaminlösung titriert wurden. Der durch Titration erhaltene Zuckerwert entsprach daher dem 10. Teil des durch die Polarisation ermittelten. Aus dem Anfangsgehalt der Versuchslösung an Zucker und den gefundenen Zuckerwerten ergeben sich die durch Glykolyse verschwundenen Zuckermengen, die als Maß der Beschleunigung und der Hemmung der Glykolyse dienten und unter der Bezeichnung „Glykolyse" in den Tabellen angegeben sind. Bei Wahl konzentrierterer Zuckerlösungen wurden die Mengenverhältnisse zur Analyse zweckentsprechend modifiziert.

Ich gebe zunächst die experimentellen Resultate, um dann noch einige Überlegungen an dieselben anzuknüpfen.

A. Glykolyse durch Phosphatmischungen.

Tabelle I.

Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung	Zusatz an			Wasserstoffionenexponent für 18°	Versuchsdauer	Nach beendigtem Versuch		Reaktion
		Wasser ccm	primär. Phosphat ccm	sekund. Phosphat ccm		Std.	Zuckergehalt %	Glykolyse (verschwundener Zucker in 100 ccm Versuchslsg.) g	
1	25 ccm Zuckerlösg. (2,5%) + 25 ccm H_2O_2 (3%)	10	—	—	7,07	44	1,02	0,02	fast neutral
2	do.	—	—	10	8,302	44	0,30	0,74	schwach alkal,
3	do.	—	0,5	9,5	7,863	44	0,30	0,74	„ „
4	do.	—	5,0	5,0	6,813	44	0,50	0,54	sauer
5	do.	—	9,5	0,5	5,600	44	0,84	0,20	„
6	20 ccm Zuckerlösg. (2,5%) + 20 ccm H_2O_2 (3%)	10	—	—	7,07	72	0,82	0,18	schwach sauer
7	do.	—	—	10	8,302	72	0,10	0,90	schwach alkal,
8	do.	—	1	9	7,648	72	0,12	0,88	„ „
9	do.	—	5	5	6,813	72	0,28	0,72	sauer
10	do.	—	9	1	5,910	72	0,82	0,18	„
11	do.	—	10	—	4,529	72	0,84	0,16	„

Aus den in Tabelle I angeführten Daten geht hervor, daß Traubenzucker in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd und Wasser bei einem Wasserstoffionenexponenten von 7,07 in 44 Stunden fast nicht zerstört wird, während bei Phosphatzusatz eine

starke Oxydation eintritt. Dieselbe ist (Versuch Nr. 4) in Gegenwart von Phosphaten noch stark vorhanden, wenn der Wasserstoffionenexponent unter dem des reinen Wassers liegt (Versuch Nr. 4 und 9), d. h. wenn die Lösung noch weniger alkalisch ist als reines Wasser. Bei einem Wasserstoffionenexponenten von 4,5 bis 5,6 ist eine nennenswerte Glykolyse nicht mehr vorhanden. Das Maximum der Glykolyse liegt in den beiden hier wiedergegebenen Versuchsreihen bei einem Wasserstoffionenexponenten von 7,6 bis 8,3, also unwesentlich höher als der Blutalkalescenz entspricht. Bei dem ausschließlichen Zusatz von sekundärem Phosphat (Versuch Nr. 2 und 7) bleibt die Reaktion trotz der starken Glykolyse noch alkalisch, während bei gleichen Mengen sekundären und primären Phosphats der Umschlag in die saure Reaktion deutlich hervortritt.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß die Glykolyse durch die Phosphationen dann herbeigeführt wird, wenn die Hydroxylionen eine bestimmte Konzentration überschreiten, so daß mit Berücksichtigung der vorhandenen und bekannten Wirkung der Hydroxylionen[1]) auf Zucker die Annahme einer katalytischen Beschleunigung der Hydroxylionenwirkung durch die Phosphationen sehr nahe gelegt wird.

Um festzustellen, in welcher Weise die absolute Menge der Phosphate bei gleichbleibender Anfangsionenkonzentration die Glykolyse beeinflußt, wurden die in Tabelle II niedergelegten Versuche angestellt. Es wurde hierbei dasjenige Verhältnis der Phosphatmischung gewählt, das die Blutalkalescenz am besten wiedergibt, $\frac{1 \text{ primäres Phosphat}}{6{,}9 \text{ sekundäres Phosphat}}$.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, bleibt die Flüssigkeitsmenge in allen Versuchen die gleiche, ebenso wie die Anfangsionenkonzentration, so daß als variabler Faktor lediglich die Phosphatmenge selbst in Betracht kommt. Aus den 3 hier wiedergegebenen Versuchsreihen geht hervor, daß die Glykolyse mit steigender Phosphatmenge ansteigt; ob bis zu einem Maximum, läßt sich auf Grund der bisherigen Daten nicht sicher entscheiden. Die Zuckerkonzentration der Versuchs-

[1]) Vgl. dazu diese Zeitschr. 23, 10, 1909.

lösung erwies sich innerhalb der Versuchsdauer für die Größe der Glykolyse als verhältnismäßig einflußlos. In den Versuchen Nr. 13 bis 24 wurde auch der Wasserstoffperoxydverbrauch bestimmt, und zwar jodometrisch. Bereits in der phosphatfreien Lösung tritt eine erhebliche Selbstzersetzung des Wasserstoffperoxyds ein. In Gegenwart der Phosphatmischungen geht der Mehrverbrauch des Wasserstoffperoxyds parallel der Glykolyse.

Tabelle II.

Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung	Zusatz an		Wasserstoffionenexponent für 37°	Versuchsdauer	Nach beendigtem Versuch		Reaktion
		Phosphatgemisch ccm	Wasser ccm		Std.	Zuckergehalt %	Glykolyse (Zuckerabnahme in 100 ccm Versuchslösung) g	
1	25 ccm Zuckerlösg. (5%) 25 ccm H_2O_2 (3%)	—	25	7,070	24	1,70	0	ganz schwach sauer
2	do.	5	20	7,456	24	1,60	0,07	sauer
3	do.	10	15	7,456	24	1,40	0,27	„
4	do.	15	10	7,456	24	1,23	0,44	ganz schwach sauer
5	do.	20	5	7,456	24	1,11	0,56	„ „ „
6	do.	25	—	7,456	24	1,04	0,63	„ „ „
7	do.	—	25	7,070	64	1,31	0,36	sauer
8	do.	5	20	7,456	64	1,14	0,53	stark sauer
9	do.	10	15	7,456	64	1,07	0,60	„ „
10	do.	15	10	7,456	64	1,03	0,64	sauer
11	do.	20	5	7,456	64	0,96	0,71	„
12	do.	25	—	7,456	64	0,96	0,71	„

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung	Zusatz an		Wasserstoffionenexponent für 37°	Nach 24 Stunden				Reaktion
		Phosphatgemisch ccm	Wasser ccm		Zuckergehalt %	H_2O_2-Gehalt %	Glykolyse in 100 ccm Versuchslösung g	H_2O_2-Verbrauch g	
13	25 ccm Zuckerlösg. (10%) 25 ccm H_2O_2 (3%)	—	50	7,070	2,50	0,35	0	0,40	neutral
14	do.	10	40	7,456	2,46	0,26	0,04	0,49	schwach alk.
15	do.	20	30	7,456	2,42	0,21	0,08	0,54	„ „
16	do.	30	20	7,456	1,98	0,19	0,52	0,56	„ „
17	do.	40	10	7,456	1,87	0,13	0,63	0,62	„ „
18	do.	50	—	7,456	1,66	0,07	0,84	0,68	alkalisch

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung	Zusatz an		Wasserstoffionenexponent für 37°	Nach 50 Stunden				Reaktion
		Phosphatgemisch ccm	Wasser ccm		Zuckergehalt %	H_2O_2-Gehalt %	Glykolyse (Zuckerabnahme in 100 ccm Versuchslösung) g	H_2O_2-Verbrauch g	
19	25 ccm Zuckerlösg. (10%) 25 ccm H_2O_2 (3%)	—	50	7,070	2,48	0,30	0,02	0,45	neutral
20	do.	10	40	7,456	2,40	0,177	0,10	0,573	sauer
21	do.	20	30	7,456	2,04	0,116	0,46	0,634	„
22	do.	30	20	7,456	1,80	0,097	0,70	0,653	sehr schwach sauer
23	do.	40	10	7,456	1,62	0,025	0,88	0,725	amphoter
24	do.	50	—	7,456	1,56	0	0,94	0,750	schwach alk.

B. Ersatz der Phosphate durch andere Substanzen.

Um die spezifische Rolle der Phosphationen bei der oxydativen Glykolyse mit Sicherheit festzustellen, wurden die gleichen Versuche mit denselben Ionenkonzentrationen wiederholt, indem die Phosphatmischungen durch andere für diese Ionenkonzentration geeignete Reaktionsregulatoren ersetzt wurden. Als solche kommen die von Sörensen und Michaelis vorgeschlagenen Mischungen in Betracht. Diese wichtige Frage ist von der vorliegenden Arbeit abgezweigt und in Gemeinschaft mit Herrn Beysel einer besonderen eingehenden Prüfung unterzogen worden, über die später berichtet wird. Nur so viel sei hier gesagt, daß bei der Herstellung der Ionenkonzentration durch andere Reaktionsregulatoren als durch Phosphate, die oxydative Glykolyse keine Beschleunigung erfährt, so daß es sich mit Sicherheit um eine ganz eigenartige Phosphatwirkung handelt. An dieser Stelle seien aber einige Versuche erwähnt, die Phosphate durch andere Substanzen zu ersetzen, die auf die Ionenkonzentrationen einen Einfluß ausüben, der aber nicht im besonderen festgestellt wurde. Die Wahl der in Tabelle III angegebenen Zusatzsubstanzen wurde durch biologische Überlegungen bestimmt. Einige starke Basen, wie Piperidin, Phenyläthylamin, Guanidincarbonat, gaben den Versuchslösungen zweifellos eine höhere Hydroxylionenkonzentration als die Phosphatmischungen.

Aus den Resultaten geht hervor, daß die Phosphate ihre Sonderstellung bei der oxydativen Glykolyse auch diesen Sub-

Tabelle III.

Nr.	Versuchslösung	Zusatz	Nach 24 Std. Zuckergehalt %	Nach 24 Std. Glykolyse g	Nach 48 Std. Zuckergehalt %	Nach 48 Std. Glykolyse g	Reaktion
1	25 ccm Zuckerlsg. (3,9%) 20 ccm H_2O_2 (3%) 20 ccm Wasser	—	1,49	0	1,44	0,06	neutral
2	do.	0.5 g Lecithin	1,50	0	1,48	0,02	sauer
3	do.	0.5 g Dinatrium-glycerinphosphat	1,50	0	1,48	0,02	neutral
4	25 ccm Zuckerlsg. (5%) 25 ccm H_2O_2 (3%)	5 ccm Wasser	2,10	0	1,54	0,46	„
5	do.	5 ccm Phosphat-gemisch	1,56	0,64	0,56	1,44	schwach sauer
6	do.	5 ccm Phenyl-äthylamin (0,5 : 50)	2,03	0,02	2,08	0,02	neutral
7	do.	5 ccm Piperidin (0,5 : 50)	1,76	0,34	1,28	0,72	„
8	20 ccm Zuckerlsg. (2,5%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	10 ccm Wasser	1,00	0	0,83	0,17	„
9	do.	10 ccm Phosphat-gemisch	0,53	0,47	0,38	0,62	schwach sauer
10	do.	10 ccm Guanidin-carbonat (1 : 100)	0,96	0,04	0,82	0,18	schwach alkalisch
11	25 ccm Zuckerlsg. (5%) 25 ccm H_2O_2 (3%)	35 ccm Wasser	1,44	0	1,32	0,12	neutral
12	do.	25 ccm Wasser 10 ccm Phosphat-gemisch	0,87	0,57	0,70	0,74	schwach sauer
13	do.	10 ccm Wasser 25 ccm Serum	1,44	0	1,32	0,12	alkalisch

stanzen gegenüber bewahren. Die stärkste Wirkung wird durch Zusatz der starken Base Piperidin (Versuch Nr. 7) erreicht; doch beträgt auch hier die Glykolyse nur die Hälfte der durch Phosphatlösungen erzielten (Versuch Nr. 5). Das stark alkalische Guanidincarbonat veranlaßt nach 48 Stunden nur etwa 35% der Glykolyse, bezogen auf die Phosphatglykolyse (Versuch Nr. 9 und 10). Auch nach beendigtem Versuche reagierte die Guanidinlösung noch alkalisch. Besonders hervorzuheben ist noch Versuch Nr. 13, bei dem durch Zusatz von Serum keine Glykolyse erzielt wurde, die über die bei Wasserzusatz beobachtete (Versuch Nr. 11) hinausgeht. Es sei bemerkt, daß das

Serum inaktiviert werden mußte, um eine katalytische Zersetzung des Wasserstoffperoxyds durch seine Katalase zu vermeiden. Zu dem Zweck wurde es 8 Tage lang täglich 2 Stunden auf 50° erwärmt, die übrige Zeit im Eisschrank gehalten. Das Serum blieb bei dieser Behandlung klar; das Wasserstoffperoxyd ist bei den Serumversuchen am Schluß des Versuches in demselben Maße vorhanden wie bei Anwendung von reinem Wasser. Messungen über den H_2O_2-Verbrauch bei gehemmter Glykolyse sind weiter unten (Tabelle V, S. 54) angegeben.

C. Die Hemmung der Phosphatglykolyse.

Nachdem durch die geschilderten Versuche erkannt war, daß die durch Phosphatzusatz erzielbare Glykolyse durch andere der geprüften Substanzen jedenfalls nicht in dem Umfange erreichbar ist, war es weiter von Interesse, zu prüfen, ob vielleicht durch ein Zusammenwirken bestimmter Stoffe mit Phosphaten eine weitere Beeinflussung der Glykolyse erzielbar ist.

Dabei ergab sich das äußerst überraschende Resultat, daß durch jeden geprüften Zusatz die Phosphatglykolyse stark gehemmt wird, auch wenn durch Zusatz einer organischen Base, wie Guanidincarbonat oder Cholin, die alkalische Reaktion noch verstärkt wurde.

Bei den in Tabelle IV angegebenen Substanzen ist das Verhalten des Wittepeptons (Versuch Nr. 4), der Gelatine (Versuch Nr. 5), des Serums (Versuch Nr. 13) und des Blutglobins[1])

[1]) Zur Darstellung des Globins aus dem Hämoglobin bedient man sich gewöhnlich der bekannten Vorschrift von Fr. N. Schulz (Ztschr. f. physiol. Chem. 24, 449, 1898). Die von mir angewandte Methode sei hier kurz beschrieben: Der möglichst scharf abgetrennte frische Blutkörperchenbrei (Rinderblut) wird 5 bis 6 mal auf der Zentrifuge mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; sodann wird der aus je 1 l stammende Blutkörperchenbrei in 1 l destilliertem Wasser gelöst, nach der Filtration wird das Hämoglobin durch 2 l Alkohol gefällt und der Niederschlag mit Alkohol und Äther gründlich ausgewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Darstellung des Blutglobins werden 10 g des so gewonnenen, staubfein zerriebenen Niederschlages in 100 ccm absolutem Alkohol, dem entweder 0,54 ccm konzentrierte Schwefelsäure oder 2,5 ccm rauchende Salzsäure zugesetzt sind, suspendiert und bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit ist die Zersetzung vollzogen, das Globin liegt als grauweißer Niederschlag in der rotbraunen Lösung; es wird abgesogen, mit Alkohol gewaschen, sodann im Soxhletapparat 24 Stunden mit absolutem Alkohol und weiter so lange mit Äther extrahiert, bis der Äther vollkommen farblos ab-

Tabelle IV.

Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung	Zusatz	Nach 24 Std. Zuckergehalt %	Nach 24 Std. Glykolyse g	Nach 48 Std. Zuckergehalt %	Nach 48 Std. Glykolyse g	Reaktion
1	25 ccm Zuckerlsg (5%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	20 ccm Phosphatgemisch	1,56	0,32	1,044	0,84	schwach sauer
2	do.	do. + 0,5 g Lecithin	1,60	0,28	1,37	0,51	sauer
3	do.	do. +0,5 g Dinatriumglycerinphosphat	1,58	0,30	1,44	0,44	„
4	do.	do. + 0,5 g Wittepepton	1,72	0,16	1,56	0,32	alkal.
5	do.	do. + 0,5 g Gelatine	1,76	0,10	1,59	0,29	„
6	25 ccm Zuckerlsg. (2,5%) 25 ccm H_2O_2 (3%)	10 ccm Wasser	1,00	0,04	0,92	0,12	schwach sauer
7	do.	10 ccm Phosphatgemisch	0,74	0,30	0,38	0,66	sauer
8	do.	do. + 0,1 g Guanidincarbonat	0,88	0,16	0,80	0,24	alkal.
9	do.	do. + 0,1 g Phloroglucin	1,00	0,04	1,00	0,04	fast neutral
10	do.	do. + 0,1 g Cholin	0,75	0,29	0,64	0,40	alkal.
11	do.	do. + 0,1 g Blutglobin	1,00	0,04	1,00	0,04	„
12	25 ccm Zuckerlsg. (10%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	20 ccm Phosphatgemisch + 30 ccm Wasser	2,30	0,33	1,87	0,76	sauer
13	do.	20 ccm Phosphatgemisch + 30 ccm Serum	2,70	0,00	2,64	0,06	alkal.
14	25 ccm Zuckerlsg. (8,5%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	20 ccm Phosphatgemisch + 10 ccm Wasser	2,10	0,70	2,00	0,80	sauer
15	do.	do. + 10 ccm KJ-Lösung (5%)	2,70	0,10	2,58	0,22	alkal.

läuft. Die Ätherextraktion erfordert etwa 48 bis 64 St. Das rückständige Globin bildet ein grauweißes Pulver, das durch Lösen in Wasser und Fällen mit Kochsalz rein weiß gewonnen werden kann. Das mit Hilfe der Salzsäure gewonnene Präparat ist leichter in Wasser löslich als das mittels Schwefelsäure dargestellte.

Tabelle IV (Fortsetzung).

Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung	Zusatz	Nach 60 Std. Zuckergehalt %	Nach 60 Std. Glykolyse g	Reaktion
16	25 ccm Zuckerlösg. (10%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	20 ccm Phosphatgemisch + 5 ccm Wasser	2,66	0,91	schwach sauer
17	do.	do. + 5 ccm ölsaures Na (10%)	3,30	0,27	neutral
18	do.	do. + 5 ccm milchsaures Na (10%)	2,77	0,80	sauer
19	do.	do. + 5 ccm bernsteins. Na (10%)	2,82	0,75	„

(Versuch Nr. 11) besonders interessant. In allen diesen Fällen zeigt sich die Phosphatglykolyse auf das stärkste gehemmt. Die Versuchslösungen haben nach Beendigung des Versuchs noch alkalische Reaktion und, wie in Tabelle V angegeben ist, nahezu denselben Wasserstoffperoxydgehalt wie in Gegenwart von reinem Wasser.

Tabelle V.

Nr.	Zusammensetzung der Versuchsflüssigkeit	Phosphatgemisch ccm	Wasser ccm	Zusatz	H'-Exponent bei 37°	Nach 48 Stunden H_2O_2 %	Zucker %	Glykolyse auf 100 ccm Versuchslösung g	H_2O_2-Verbrauch auf 100 ccm Versuchslösung g	Reaktion
1	25 ccm Zuckerlösg. (5,5%) 20 ccm H_2O_2 (2,78%)	—	10	—	7,07	2,47	2,42	0,08	0,31	neutral
2	do.	10	—	—	7,456	1,66	2,31	0,19	1,12	sauer
3	do.	10	—	0,5 g Witte-pepton	7,456	2,55	2,41	0,09	0,23	alkal.

Also gerade Stoffe, die für den biologischen Versuch von Bedeutung sind, bringen die Glykolyse auch in Gegenwart von Phosphaten fast vollständig zum Stillstand. Weniger stark hemmend wirkt Lecithin (Versuch Nr. 2, Tabelle IV). Auch die Natriumsalze der in Versuch Nr. 17 bis 19 (Tabelle IV) geprüften Säuren rufen zum Teil eine geringere Hemmung her-

Tabelle VI.

Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung	Zusatz	Ursprüngl Zuckergehalt %	Nach 48 Std. Zuckergehalt %	Nach 48 Std. Glykolyse %	Reaktion
1	25 ccm Zuckerlösg. (10%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	20 ccm Phosphatgemisch 5 ccm Wasser	3,57	2,30	1,27	sauer
2	do.	do. + 0,5 g Wittepepton	3,57	3,20	0,37	alkal.
3	do.	do. + 0,5 g 1% Lecithinlösung	3,57	2,50	1,07	sauer
4	do.	do. + 0,5 g 1% Lecithinlösg. + 0,5 g Wittepepton	3,57	3,30	0,27	alkal.
5	25 ccm Zuckerlösg. (5%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	20 ccm Phosphat	1,82	1,12	0,70	sauer
6	do.	do. + 0,5 g Wittepepton	1,82	1,72	0,10	alkal.
7	do.	do. + 0,5 g Wittepepton + 0,5 g Lecithin	1,82	1,60	0,22	„
8	do.	do. + 0,5 g Gelatine	1,82	1,82	0	„
9	do.	do. + 0,5 g Gelatine + 0,5 g Lecithin	1,82	1,56	0,26	„
				Nach 60 Std.		
10	25 ccm Zuckerlösg. (10%) 20 ccm H_2O_2 (3%)	20 ccm Phosphatgemisch 5 ccm Wasser	3,57	2,00	1,57	sauer
11	do.	do. + 0,5 g Wittepepton	3,57	3,44	0,13	alkal.
12	do.	do. + 0,5 g Wittepepton + 5 ccm öls. Na (10%)	3,57	3,40	0,17	„
13	do.	do. + 0,5 g Wittepepton + 5 ccm milchsaures Na (10%)	3,57	3,52	0,05	„
14	do.	do. + 0,5 g Wittepepton + 5 ccm bernsteinsaures Na (10%)	3,57	3,36	0,21	„
15	do.	do. + 10 ccm KJ-Lösg. (5%) + 0,5 g Wittepepton	3,57	3,44	0,13	„

vor, die geringste das milchsaure Natrium, die stärkste das ölsaure Natrium. Jodkalium (Versuch Nr. 15), das aus einem später noch zu erwähnenden Gesichtspunkt gewählt wurde, hemmt stark.

Um weiter zu prüfen, ob eine gehemmte Phosphatglykolyse durch Zusatz bestimmter Stoffe wieder beschleunigt werden kann, wurde der Einfluß von Zusätzen zu Wasserstoffperoxyd-Zuckerlösungen untersucht, die außer Phosphat noch Wittepepton oder Gelatine enthalten.

Als Zusätze dienten Lecithin, ölsaures Natrium, milchsaures Natrium, bernsteinsaures Natrium und Jodkalium, ohne daß es gelang, durch einen dieser Stoffe die Hemmung aufzuheben. Die Resultate gehen aus der Tabelle VI so deutlich hervor, daß eine Besprechung der einzelnen Fälle überflüssig erscheint.

Die Tatsache der oxydativen Phosphatglykolyse und ihrer Hemmung, speziell durch Peptone, Eiweißstoffe und Serum, lenkt die Bearbeitung des Problems auf verschiedene Punkte.

Ich habe bereits erwähnt, daß die Frage nach der Wirkung der durch andere Reaktionsregulatoren, wie durch Essigsäure und Acetate, Borsäure und Borate, Glykokoll und Natronlauge hergestellten Ionenkonzentrationen gemeinsam mit Herrn Beysel in Angriff genommen worden ist.

Die zweite Frage, die in den vorliegenden Versuchen nur mit negativen Resultaten beantwortet werden konnte, bezieht sich auf die Wiederherstellung der Phosphatglykolyse in Gegenwart hemmender Substanzen. Ein Schluß aus den bisherigen Ergebnissen ist der, daß das Serum als Schutzmittel für den Bestand des Zuckers wirkt, wie denn auch das Blut normalerweise einen bestimmten Zuckergehalt aufweist. Es handelt sich also darum, zu ermitteln, durch welche experimentellen Hilfsmittel die Bedingungen für die oxydative Zuckerzerstörung, die durch die Phosphate zwar vorhanden, durch die anderen Stoffe aber gleichsam ausgeschaltet sind, wieder hergestellt werden können. Theoretisch bietet sich hier eine Reihe von Möglichkeiten. Es können entweder katalytisch wirkende Stoffe auftreten, die im Organismus, etwa von Organen erzeugt, in das Blut, in die Muskeln und an die Gewebe gelangen und den entgegengesetzt wirkenden, hemmenden Einfluß anderer Stoffe überwinden. Diese Katalysatoren können enzymatische Natur besitzen. Eine spezielle Form solcher Katalysatoren bilden die Sauerstoffüberträger, die als Bestandteile sog. gekoppelter[1]) Reaktionen tätig sind. Speziell die Eisensalze wirken bekanntlich in dieser Richtung.

---

[1]) Vgl. Luther und Schilow, Zeitschr. f. physikal. Chem. 46, 477, 1903.

Schließlich ist noch die folgende Möglichkeit zu berücksichtigen, die zu dem freilich erfolglosen Versuch führte, durch Jodkaliumzusatz die gehemmte Phosphatglykolyse zu heben, sowie durch Jodkalium eine Glykolyse ohne Phosphate herbeizuführen. Bei der Annahme einer der Oxydation des Zuckers vorausgehenden Spaltung ist auf Grund meiner früheren Untersuchungen über diese Frage stets Formaldehyd als ein Komponent der Spaltung anzusehen. Es erschien theoretisch nicht ausgeschlossen, eine Hemmung dieser Spaltungen aufzuheben oder diese Spaltungen zu beschleunigen, wenn der Formaldehyd, soweit und sobald er auftritt, oxydiert wird und als Faktor des Spaltungsgleichgewichtes verschwindet. Da der Formaldehyd durch Jod in alkalischer Lösung leicht oxydiert wird, so schien wegen der Gegenwart des Wasserstoffperoxyds ein Zusatz von Jodkalium genügend, um für die Oxydation des Formaldehyds geeignete Bedingungen zu schaffen. Die Erfolglosigkeit dieser Versuche veranlaßte eine besondere Bearbeitung der Oxydationsfähigkeit des Formaldehydes unter den zur Phosphatglykolyse geeigneten Bedingungen. Über diese gleichfalls in Gemeinschaft mit Herrn Beysel ausgeführten Messungen wird später berichtet. Sie haben für die vorliegende Frage noch keine Bedeutung gewonnen.

Zusammenfassung.

1. In salzfreien Zuckerlösungen findet durch neutrales Wasserstoffperoxyd nur eine verschwindend geringe oxydative Glykolyse statt.

2. Die Glykolyse erfährt durch Steigerung der Hydroxylionenkonzentration eine ganz erhebliche Beschleunigung.

3. Bei der geringen Hydroxylionenkonzentration in Lösungen von Blutalkalescenz, die nur unwesentlich von der des reinen Wassers abweicht, ist die Glykolyse sehr gering, wenn sie nicht durch Phosphatzusatz beschleunigt wird.

4. Die Phosphationen wirken auf die Glykolyse durch Hydroxylionen beschleunigend; die günstigste Hydroxylionenkonzentration innerhalb der geprüften Grenzen liegt bei $p_{H'} = 8{,}302$ bis $7{,}070$. Bei $p_{H'} \gtrless$ ca. $5{,}600$ findet eine nachweisbare Hydroxylionenwirkung, die über die des reinen Wassers hinausgeht, auch in Gegenwart von Phosphationen nicht mehr statt.

5. Die Beschleunigung der Glykolyse steigt bei gleichbleibender OH'-Konzentration mit der absoluten Menge der zugesetzten Phosphate.

6. Bei Ersatz der Phosphate durch Serum, Lecithin, Dinatriumglycerinphosphat, Phenyläthylamin, findet keine Glyko-

lyse statt, während Guanidin eine schwache, Piperidin eine etwas stärkere Glykolyse veranlaßt.

7. Die Phosphatglykolyse wird durch Zusatz von Serum, Lecithin, Dinatriumglycerinphosphat, Guanidin, Phloroglucin, Cholin, Blutglobin, Jodkalium, Wittepepton, Gelatine stark gehemmt bzw. ganz aufgehoben, obgleich bis zum Schlusse der Versuche die OH'-Konzentration (alkalische Reaktion gegen Lackmus) erhalten und Wasserstoffperoxyd im Überschuß bleibt. Bei Anwendung von Wittepepton in Phosphat-Zuckerlösung ist der H_2O_2-Verbrauch nicht größer, als in rein wässeriger Zuckerlösung.

Ölsaures Natrium hemmt die Phosphatglykolyse stark; weniger hemmend wirken bernsteinsaures und milchsaures Natrium.

8. Die durch Wittepepton oder Gelatine in Phosphatlösung verursachte Hemmung wird durch Zusatz von Lecithin nicht aufgehoben. Ebensowenig gelingt es durch Zusatz von ölsaurem, milchsaurem und bernsteinsaurem Natrium und von Jodkalium eine Beseitigung der Hemmung herbeizuführen.

Biochemische Untersuchungen über aromatische Quecksilberverbindungen.

I. Mitteilung.

Von

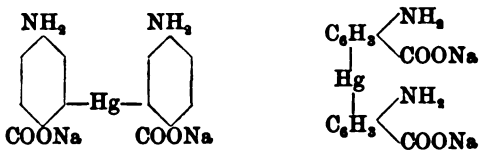
Ferdinand Blumenthal.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts und der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 8. März 1911.)

Die große Wirksamkeit, die das Atoxyl im Vergleich zu andern Arsenkörpern entfaltete, die vor ihm in der Medizin Anwendung gefunden hatten, veranlaßte mich, Quecksilberverbindungen zu untersuchen, in denen das Quecksilber sich in ähnlicher Bindung befand wie das Arsen im Atoxyl, d. h. im Benzolkern fixiert. Wie wir die Chemie der aromatischen Arsenkörper besonders Michaelis in Rostock verdanken, so hat Dimroth am eingehendsten eine Anzahl aromatischer Quecksilberverbindungen studiert und hat das o-Nitrophenylquecksilberchlorid $C_6H_4NO_2HgCl$, ferner ein salzartiges Anhydrid der Oxymercuribenzoesäure $C_6H_4\begin{cases}CO_2H\\HgOH\end{cases}$ und andere Verbindungen dargestellt. Von Pesci wurde dann die Einwirkung von Quecksilbersalz auf Anilin untersucht, aber die Struktur der von ihm dargestellten Verbindungen nicht richtig gedeutet. Erst Dimroth erkannte diese Körper als o- und p-Aminophenylquecksilberacetat $NH_2.C_6H_4.HgO.COCH_3$. Es ist klar, daß die pharmakologische Untersuchung solcher Substanzen, die ich mir zur Aufgabe gestellt hatte, in erster Linie bezwecken sollte, ihre Verwendbarkeit für die Syphilis zu prüfen. Hier liegt insbesondere das Bedürfnis vor nach einem wasserlöslichen und lokal möglichst indifferenten Prä-

parat, denn an guten Quecksilberpräparaten fehlt es keineswegs, weder an löslichen, z. B. das Sublimat, noch an unlöslichen, z. B. das Kalomel. Beide machen aber starke lokale Reaktionen, und ihre Einspritzungen sind äußerst schmerzhaft. Es galt also ein Quecksilberpräparat zu finden, das nicht nur die bisherigen Quecksilberpräparate an Wirksamkeit mindestens erreichte, wenn möglich übertraf, sondern auch an Ungiftigkeit, Schmerzlosigkeit und geringen lokalen Reaktionen den bisherigen Verbindungen überlegen war. Verschiedene Versuche, aromatische Quecksilberverbindungen, die sich zur Therapie eigneten, darzustellen, wurden seit 2 Jahren auf meine Veranlassung unternommen, hatten aber zu einem therapeutisch brauchbaren Resultat nicht geführt. Die vorhandenen oder neu dargestellten Verbindungen, soweit sie mir zugänglich waren, erwiesen sich als zu giftig oder als unbeständig und dadurch in ihrer Konstitution so wechselnd, daß die Hoffnung auf eine praktische Verwendung bisher nicht aussichtsvoll war. Unabhängig davon hat Herr Dr. Lüdecke im Laboratorium der Vereinigten chemischen Werke in Charlottenburg eine Verbindung hergestellt, die nach meinen Untersuchungen von medizinischem Interesse ist. Es handelt sich um das diaminodiphenylmercuridicarbonsaure Natrium



Dieser Körper bildet sich durch Reduktion einer Verbindung, die man erhält, wenn man das Quecksilbersalz der Nitrobenzoesäure auf sehr hohe Temperaturen erhitzt.

Diese Verbindung enthält 38% Quecksilber. Sie ist in kaltem Wasser leicht löslich und stellt ein weißes bis gelbliches krystallinisches Pulver dar, das sich in Wasser mit gelber bis gelbbrauner Farbe auflöst. Aus der Lösung wird durch Salzsäure die freie Säure ausgefällt, die sich beim Erwärmen im Überschuß von Salzsäure löst. Weder durch kurzes Kochen mit Salzsäure noch mit Lauge wird anorganisches Quecksilber abgespalten. Natriumcarbonat ruft langsam eine Trübung hervor, die sich allmählich zu einem Niederschlag verdichtet.

Die Substanz fällt Eiweiß nicht aus den Lösungen, wie ich durch Versuch mit Milch und Blutserum feststellte, während durch Sublimat sehr schnell aus beiden das Eiweiß koaguliert

wird. Das Quecksilber sitzt in ihr in so fester Bindung, daß es auch durch Schwefelwasserstoff nicht als Quecksilbersulfid nachweisbar ist.

Da diese Quecksilberverbindung 2 Aminogruppen enthalten sollte, so ließ sich erwarten, daß sie sich mit Salzsäure und Natriumnitrit diazotieren und mit α-Naphthol bzw. α-Naphthylamin zu Farbstoffen kuppeln ließ. Diese Reaktion kommt ja auch dem Atoxyl zu, dessen Diazotierung zuerst von Ehrlich und Bertheim[1]) vorgenommen wurde. In der Tat zeigte sich die Richtigkeit dieser Voraussetzung. Versetzt man nämlich 1,0 g der Substanz in wässeriger Lösung mit 10 bis 20 Tropfen Salzsäure, so fällt die Diaminodiphenylmercuridicarbonsäure aus, fügt man nunmehr 10 bis 20 Tropfen einer 1%igen Natriumnitritlösung hinzu und schüttelt unter Kühlen, so nimmt die Flüssigkeit mitsamt der ausgefallenen Säure eine bräunliche Färbung an. Setzt man nunmehr eine entsprechende Menge a-Naphthylamin in salzsaurer Lösung hinzu, so bildet sich allmählich eine violettblaue Trübung, die immer stärker wird und sich beim Stehenlassen zu einem schönen blauvioletten Niederschlag verdichtet. Der Niederschlag läßt sich abfiltrieren und mit salzsaurem Wasser waschen. Er löst sich mit schöner blauvioletter Farbe in Alkohol. Verdampft man die alkoholische Lösung, so bleibt ein blaugefärbter Rückstand, der in heißem Wasser schwer und in Alkohol leicht löslich ist. Die Lösung, die violett gefärbt ist, nimmt auf Zusatz von Salzsäure einen stärker blauen Farbenton an und läßt allmählich einen blauen Niederschlag ausfallen. Bei Zusatz von Natronlauge wird die Lösung gelbbraun.

Nimmt man nach der Diazotierung anstatt α-Naphthylamin α- oder β-Naphthol in alkalischer Lösung (Natronlauge), so färbt sich die Flüssigkeit im Überschuß von Natronlauge purpurrot. Beide Reaktionen mit Naphthylamin oder Naphthol gibt auch der Harn der mit der Quecksilberverbindung behandelten Tiere. Für den Harn eignet sich zum Nachweis der Verbindung ebenso wie beim Atoxyl besser die α-Naphtholprobe,[2]) die ich stets in folgender Weise angestellt habe.

[1]) Ehrlich und Bertheim, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 3239, 1907.

[2]) F. Blumenthal, diese Zeitschr. 10, 240, 1908.

Zirka 10 ccm Harn werden mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert, dann unter leichtem Schütteln mit 2 Tropfen 1%iger Natriumnitritlösung versetzt. Dazu fügt man eine frisch bereitete Lösung von α-Naphthol in Natronlauge. Es entsteht ein purpurrot tingierter Niederschlag, der sich im Überschuß von Natronlauge mit prachtvoll himbeerroter Farbe löst. Normaler Harn gibt eine braune Lösung.

Von maßgebender Bedeutung für die therapeutische Verwendbarkeit der Verbindung sind folgende Tierversuche.

Toxikologische Untersuchung.[1])

a) Versuche an Kaninchen.

Versuch Nr. 1. Ein Kaninchen von 2520 g erhält am 10. September 1910 0,5 g in 10 ccm Wasser subcutan. Das Tier ist dauernd gesund.

Versuch Nr. 2. Ein Kaninchen von 1980 g erhält am 10. September 1910 0,3 g subcutan in 10 ccm Wasser gelöst; das Tier ist dauernd gesund.

Versuch Nr. 3. Ein Kaninchen von 1620 g erhält am 7. November 0,4 g in 10 ccm Wasser gelöst subcutan; das Tier ist dauernd gesund.

Versuch Nr. 4. Ein Kaninchen von 1330 g erhält am 7. November 0,3 g in 5 ccm Wasser gelöst subcutan; das Tier ist dauernd gesund.

Versuch Nr. 5. Ein Kaninchen von 2070 g erhält am 14. November 0,75 g in 15 ccm Wasser gelöst. Am nächsten Tage werden 240 ccm Harn entleert, welche die α-Naphtholprobe geben. Der Urin ist eiweißfrei. Am 16. November ist die α-Naphtholprobe negativ, es werden 335 ccm Harn ausgeschieden. Das Tier bleibt dauernd gesund.

Versuch Nr. 6. Ein Kaninchen von 2040 g erhält am 14. Januar 0,6 g in 15 ccm Wasser gelöst subcutan; das Tier bleibt dauernd gesund.

Versuch Nr. 7. Am 19. Januar wird einem Kaninchen von zirka 2700 g 1 g in 20 ccm Wasser subcutan eingespritzt. Am 20. Januar werden 60 ccm Harn entleert. Der Urin ist frei von Eiweiß und Zucker. Die α-Naphtholprobe ist stark positiv. Das Tier hat wenig gefressen, macht aber keinen kranken Eindruck. Am 21. Januar werden 250 ccm Harn entleert, die α-Naphtholprobe ist schwach. Der Urin enthält kein Eiweiß und Zucker. Das Kaninchen scheint von nun ab vollkommen gesund zu sein. Es erhält am 26. Januar zum zweiten Male 1 g in 20 ccm Wasser gelöst subcutan unter die Rückenhaut, auf jede Seite die

[1]) Ein Teil dieser Tierversuche ist mit Präparaten angestellt, in denen noch andere aromatische Quecksilberverbindungen in kleinen Quantitäten beigemengt waren. Dadurch erniedrigte sich der Quecksilbergehalt dieser Präparate auf ca. 35% statt 38%. In der Zwischenzeit ist es gelungen, eine zweite Verbindung ebenfalls zu isolieren. Sie wird in der folgenden Arbeit beschrieben werden.

Hälfte. Am 27. Januar sind 180 ccm Harn entleert. Der Harn ist gelbbraun, klar, alkalisch, enthält kein Eiweiß und keinen Zucker. Es besteht kein Durchfall, da α-Naphtholreaktion ist sehr stark, die Freßlust ist etwas verringert. Am 28. Januar sind 80 ccm Harn entleert, die Eiweißprobe ist zweifelhaft, die Zuckerprobe ist negativ, die α-Naphtholprobe ist stark. Das Tier hat gestern wenig gefressen, heute ist die Nahrungsaufnahme gut. Am 29. und 30. Januar sind zusammen 480 ccm Harn entleert. Das Tier ist gesund. Am 1. Februar wird an der Bauchhaut eine dreimarkstückgroße Nekrose gefunden, an der Injektionsstelle ist nichts zu bemerken. Das Gewicht des Tieres ist 2460 g. Am 5. März ist die Nekrose verheilt.

Versuch Nr. 8. Am 24. Januar bekommt ein Kaninchen von 2930 g 1,5 g der Quecksilberverbindung in 25 ccm heißem Wasser gelöst subcutan. Die Freßlust des Tieres ist nicht verringert, so daß innerhalb der ersten 24 Stunden über 500 ccm Harn entleert werden. Der Harn ist gelbbraun und klar. Die α-Naphtholreaktion ist sehr stark, Eiweiß und Zucker sind nicht vorhanden. Am 26. Januar sind ebenfalls zirka 500 ccm Harn entleert, die α-Naphtholprobe ist negativ. Das Tier scheint dauernd gesund zu sein. Dieses Kaninchen erhält am 1. Februar 1 g derselben Substanz in 20 ccm Wasser gelöst subcutan. Sein Gewicht beträgt 2640 g. Am 2. Februar sind 325 ccm Harn entleert. Der Harn ist klar und reagiert stark alkalisch. Er enthält eine Spur Eiweiß und reduziert Kupfersulfatlösung, zeigt aber im Polarisationsapparat keine Drehung. Die α-Naphtholprobe und die Probe mit α-Naphthylamin sind stark positiv. Beim Kochen mit Salzsäure und Chromsäure dunkelt der Harn, auf Zusatz von Eisenchlorid gibt er eine rötlichbraune Färbung. Ein Teil des Harns wird zur Darstellung der α-Naphthylaminverbindung verwandt.

Am 3. Februar 370 ccm Harn. Kein Eiweiß, α-Naphtholprobe schwach.

Am 4. Februar 400 ccm Harn. α-Naphtholprobe negativ. Das Tier wird bis zum 1. März beobachtet. Es bleibt dauernd gesund. Es hat also 2,5 g, in zwei Dosen subcutan gereicht, gut vertragen.

Versuch Nr. 9. Am 26. Januar erhält ein Kaninchen von 2710 g 0,5 g in 25 ccm Wasser per os. Am 27. Januar werden 70 ccm Harn aus der Blase gepreßt; der Harn ist gelbbraun, frei von Eiweiß und Zucker, die α-Naphtholprobe ist deutlich, aber nicht stark. Der Harn ist klar, reagiert alkalisch. Die Nahrungsaufnahme ist gering, der Kot des Tieres ist fest. Am 28. Januar sind 270 ccm Harn entleert, der Urin ist nicht mehr so klar wie am Tage vorher. Die α-Naphtholreaktion ist negativ, ebenso ist kein Eiweiß und kein Zucker vorhanden. Die Nahrungsaufnahme ist gut. Am 30. und 31. Januar werden zusammen 770 ccm Harn gelassen. Am 30. Januar erhält das Kaninchen 1 g in 30 ccm Wasser gelöst per os. Am nächsten Tage wird der feste Kot mit Wasser auf dem Wasserbade erhitzt und dann mit der Probe des Auszuges die α Naphtholreaktion angestellt, dieselbe ist negativ. Am 31. Januar werden 120 ccm Harn gelassen, die frei von Eiweiß sind

und eine deutliche α-Naphtholreaktion geben. Am 1. Februar beträgt die Harnmenge 140 ccm; der Harn ist klar und alkalisch. Die α-Naphtholreaktion ist stärker als am Tage zuvor, Eiweiß und Zucker sind nicht vorhanden. Beim Kochen mit Salzsäure und Chromsäure wird der Harn dunkelbraun. Die Naphthylaminprobe ist stark. Am 2. Februar sind 110 ccm Harn entleert, Eiweiß ist nicht vorhanden. Die Naphtholprobe ist stark positiv. Am 6. Februar werden 350 ccm Harn gelassen, die noch immer die Naphtholprobe, wenn auch schwach, erkennen lassen. Der Urin enthält eine Spur Eiweiß. Von da ab ist der Urin eiweißfrei und gibt nicht mehr die Naphtholprobe. Tier dauernd gesund, bis 2. März beobachtet. Das Tier hat also 1,5 g per os anstandslos vertragen.

Versuch Nr. 10. Ein Kaninchen von 2200 g bekommt 2 g der Quecksilberverbindung am 28. Januar subcutan eingespritzt unter die Rückenhaut in 30 ccm Wasser gelöst, auf jede Seite werden 15 ccm eingespritzt. Das Tier läßt bis zum 4. Februar keinen Harn und wird an diesem Tage tot aufgefunden. Bei der Sektion finden sich in der Blase 80 ccm eines hellen, schwach eiweißhaltigen Harns, der eine starke Naphthol- und starke Naphthylaminreaktion gibt. Bei der Sektion zeigen beide Seiten unterhalb der Rückenhaut bis fast zur Bauchhaut hinunter eine starke gelbe Färbung, die offenbar von dem injizierten Präparat herrührt. Eine Nekrose ist nicht zu erkennen. Bei der Sektion ist die Niere außen hämorrhagisch, innen blaß und trübe. Die Grenze zwischen Mark und Rinde ist hyperämisch, die Leber derb hyperämisch, die Milz weich, der Dünndarm stark injiziert, am Dickdarm ist nichts zu bemerken. Der Kot, der makroskopisch etwas dunkel aussieht, ist breiig, enthält kein Blut. Sein wässeriger Auszug gibt aber eine ziemlich starke α-Naphtholreaktion, woraus hervorgeht, daß bei diesem Kaninchen ein Teil der Substanz durch den Darm ausgeschieden wurde. Da bei den lebendgebliebenen Kaninchen im Stuhl bisher keine Substanz bzw. kein aromatisches Quecksilber nachgewiesen werden konnte, so muß man annehmen, daß bei diesem mit der exorbitanten Dosis von 2 g gespritzten Kaninchen ein Teil, weil er die Niere als Ausfuhrort versperrt fand, den Weg aus dem Körper heraus durch den Darm wählte.

Ich möchte hier bemerken, daß der Kot der subcutan mit der Quecksilberverbindung gespritzten Tiere immer fest war; ich habe bisher in keinem Falle Diarrhöe beobachtet, nur ein Tier, Versuch Nr. 11, bekam, nachdem es bereits aus dem Versuch entlassen war, 12 Tage nach der Injektion einen Darmkatarrh, an dem es starb.

Versuch Nr. 11. Ein Kaninchen von 2640 g bekommt 1 g der Quecksilberverbindung in 20 ccm Wasser gelöst subcutan am 1. Februar.

Am 2. Februar sind 325 ccm Harn gelassen. Der Harn ist klar und alkalisch, enthält eine minimale Spur Eiweiß, die α-Naphtholreaktion ist sehr stark. Die Trommersche Reaktion ist zweifelhaft. Mit Chrom-

und Salzsäure gekocht, wird der Harn dunkel, die Naphthylaminprobe ist stark positiv.

Am 3. Februar werden 370 ccm Harn entleert, die α-Naphtholprobe ist schwach, aber positiv, die Probe mit Naphthylamin ist ebenfalls schwach; Eiweiß ist nicht vorhanden.

Am 4. Februar Urinmenge 400 ccm, α-Naphtholprobe negativ. Das Kaninchen wird am 12. Februar anscheinend gesund aus dem Versuch entlassen, am 14. Februar wird es tot im Stalle aufgefunden. Die Sektion ergibt wässerigen Darminhalt. An der Injektionsstelle starke Gelbfärbung. Keine sonstige Veränderung.

Versuch Nr. 12. Ein Kaninchen, Gewicht 2300 g, erhält 0,1 g der Quecksilberverbindung in 5 ccm Wasser subcutan am 6. Februar. Am selben Tage noch werden 400 ccm Harn gelassen, Eiweiß negativ, α-Naphtholprobe schwach.

Am 7. Februar erhält das Kaninchen zum 2. Male eine Einspritzung, dieses Mal 0,2 g der Quecksilberverbindung.

Am 8. Februar sind 300 ccm Harn gelassen, die α-Naphtholprobe ist positiv.

Am 9. Februar ist die α-Naphtholprobe negativ, wieder 300 ccm Harn. Das Tier erhält eine 3. Einspritzung von 0,2 g der Quecksilberverbindung. Eiweiß ist nicht vorhanden.

Am 10. Februar sind 290 ccm Harn vorhanden, Eiweiß negativ. Das Tier erhält zum 4. Male eine Einspritzung von 0,2 g der Quecksilberverbindung.

Am 11. Februar sind 375 ccm Harn vorhanden, die α-Naphtholprobe ist deutlich, Eiweiß negativ.

Am 12. und 13. Februar werden zusammen 470 ccm Harn entleert, Eiweiß negativ, α-Naphtholprobe negativ. Das Tier bekommt zum 5. Male eine Einspritzung von 0,2 g der Quecksilberverbindung.

Am 14. Februar Urinmenge 260 ccm, Eiweiß negativ, α-Naphtholprobe negativ.

Am 15. Februar Urinmenge ungefähr 600 ccm, Eiweiß negativ, α-Naphtholprobe negativ.

Am 16. Februar Urinmenge 350 ccm, Eiweiß negativ, α-Naphtholprobe negativ.

Am 17. Februar Urinmenge verloren gegangen. Das Tier bekommt 0,3 g der Quecksilberverbindung subcutan (6. Einspritzung).

Am 18. Februar ist das Tier ganz gesund, Urinmenge verloren gegangen.

Am 20. Februar bekommt das Tier die 7. Injektion, 0,3 g in 10 ccm Wasser subcutan. Urinmenge 360 ccm.

Am 21. Februar beträgt die Urinmenge 325 ccm; Naphtholprobe ist stark positiv, kein Eiweiß.

Am 22. Februar beträgt die Urinmenge 350 ccm, Naphtholprobe zweifelhaft.

Am 23. Februar Urinmenge 320 ccm, Naphtholprobe negativ.

Am 24. Februar 8. Injektion von 0,3 g 10 in ccm Wasser subcutan.

Am 25. und 26. Februar Urinmenge 475 ccm, Eiweiß negativ, Naphtholprobe schwach.

Am 27. Februar Urinmenge 310 ccm, Naphtholprobe negativ, Eiweiß negativ.

Am 3. März 9. Injektion von 0,7 g in 10 ccm Wasser gelöst.

Am 4. März Urinmenge 370 ccm, α-Naphthol- und α-Naphthylaminprobe stark positiv. Tier anscheinend gesund.

Am 5. und 6. März 520 ccm Harn, α-Naphtholprobe schwach.

Am 7. März sind 200 ccm Harn gelassen; Naphtholprobe, Eiweiß negativ.[1])

Versuch Nr. 13. Ein Kaninchen von 2020 g erhält am 3. März 1,8 g in 10 ccm Wasser gelöst.

Am 4. März sind 70 ccm Urin gelassen. Spur Eiweiß, α-Naphthol- und α-Naphthylaminprobe sehr stark. Das Tier ist in der Nacht vom 5. zum 6. März gestorben.

Sektion: Darm nicht hämorrhagisch, flüssiger Inhalt, der die α-Naphtholprobe gibt. Nieren glasig, Rinde hämorrhagisch. Auch hier wurde Substanz in den Darm ausgeschieden.

Versuch Nr. 14. Ein Kaninchen von 2740 g erhält von einer Lösung 0,3 auf 10 Wasser 4 ccm intravenös, d. h. etwas über 0,1 g am 6. Februar. Der noch am selben Tage gelassene Harn ist eiweißfrei, gibt eine schwache α-Naphtholreaktion, Urinmenge 110 ccm.

Am 7. Februar ist die Urinmenge 350 ccm, die α-Naphtholprobe ist negativ.

Am 8. Februar ist die Urinmenge ca. 400 ccm, eiweißfrei, die α-Naphtholprobe ist negativ.

Am 9. Februar Urinmenge 450 ccm.

Am 10. Februar Urinmenge 320 ccm, kein Eiweiß.

Am 17. Februar erhält das Kaninchen 1 g der Quecksilberverbindung per os durch die Magensonde in 25 ccm.

Am 18. Februar ist das Tier anscheinend völlig gesund, 350 ccm Harn sind entleert, der kein Eiweiß enthält, die α-Naphtholprobe ist deutlich, der Darminhalt ist fest.

Am 19. und 20. Februar 575 ccm Harn; die α-Naphtholprobe ist negativ. Das Tier ist dauernd gesund.

Versuch Nr. 15. Kaninchen von 2350 g erhält 1,7 g der chemisch reinen Verbindung (38% Hg) in 100 ccm Wasser gelöst am 3. März. Am 4. März sind 70 ccm Wasser gelassen. Spur Eiweiß. α-Naphtholprobe sehr stark. Von da ab Anurie; tot am 8. März. Sektion: Nieren glasig; Darmgefäße injiziert, Darminhalt gibt α-Naphtholprobe.

---

[1]) Anm. bei der Korrektur. Das Kaninchen erhielt am 8. und 11. März noch einmal 0,5 g des reinen Präparats (38% Hg) subcutan und zeigte bis zum 16. März nicht die geringsten Krankheitserscheinungen. Es hat also im ganzen 3,5 g innerhalb 5 Wochen subcutan bekommen. Dieser Versuch beweist, daß auch wiederholte Einspritzungen mittelgroßer Dosen nicht schädlich sind.

Versuch 16 u. 17. Ein Kaninchen von 2120 g erhält 0,7 g und ein Kaninchen von 2610 g 1,0 g der chemisch reinen Verbindung subcutan. Beide Tiere dauernd gesund.

Versuch Nr. 18. Ein Kaninchen von 2950 g erhält 1 g der Quecksilberverbindung subcutan und wird nach 6 Stunden getötet. Das Blut wird mit Wasser verrieben und enteiweißt durch Aufkochen und Zusetzen von Essigsäure. Das Filtrat gibt keine α-Naphtholreaktion. Der wässerige Auszug der Leber gibt ebenfalls keine Naphtholreaktion. 65 ccm Harn sind innerhalb der 6 Stunden gelassen worden, die α-Naphtholprobe ist ungemein stark.

Im Vergleich zu unserer Quecksilberverbindung wird vom Sublimat nur sehr wenig vertragen.

Versuch Nr. 1. Einem Kaninchen von 2070 g werden 0,05 g Sublimat injiziert. Das Tier stirbt nach 48 Stunden, nachdem es bis dahin eine vollständige Anurie gezeigt hatte. Bei der Sektion finden sich Hämorrhagien im Darm und eine schwere hämorrhagische Entzündung der Nieren.

Versuch Nr. 2. Kaninchen von 1810 g erhält am 25. Februar von einer Sublimatlösung 0,3:10,0 1 ccm. Am 26. Februar 70 ccm glasig, grünlicher, stark eiweißhaltiger Harn. Schwer krank. Es stirbt am 1. März.

Versuch Nr. 3. Kaninchen von 2820 g erhält am 25. Februar von derselben Sublimatlösung 2 ccm = 0,04 g. Am 26. Februar beträgt die Urinmenge 20 ccm. Er ist glasig, grün, stark Eiweiß. Kaninchen schwer krank, gestorben am 27. Februar. Sektion: hämorrhagische Nephritis und Blutungen im Darm.

Nehmen wir 1,0 g als die Dosis, die ein Kaninchen von 2 bis $2^1/_2$ kg von dem diaminodiphenylmercuridicarbonsauren Natrium ohne besondere Krankheitserscheinungen verträgt, so dürfte dies 0,02 g höchstens für Sublimat sein. Wir bringen mit 0,02 g Sublimat in den Körper 0,0148 g Hg und mit 1,0 g Natriumsalz unserer Verbindung 0,380 g Hg.

Daraus geht hervor, daß wir mit einer einzigen, nicht toxischen Dosis von unserer Verbindung beim Kaninchen über 20mal soviel Quecksilber in den Organismus hineinbringen können als mit Sublimat.

b) Versuche an Ratten.[1])

Versuch Nr. 1. Eine Ratte erhält am 18. Januar 0,05 g der Quecksilberverbindung in 5 ccm Wasser subcutan. Sie bleibt dauernd gesund.

---

[1]) Die Rattenversuche sind, wo nichts Besonderes vermerkt ist, mit Ratten von 70 bis 80 g Gewicht angestellt.

Versuch Nr. 2. Eine Ratte erhält am 19. Januar 0,1 g der Quecksilberverbindung in 5 ccm Wasser gelöst. Das Tier bleibt dauernd gesund.

Versuch Nr. 3. Am 20. Januar erhält eine Ratte 0,2 g der Quecksilberverbindung in 10 ccm Wasser gelöst. Bei der Einspritzung fließt etwas wieder heraus, ungefähr 1 ccm. Das Tier bleibt dauernd gesund.

Versuch Nr. 4. Eine große Ratte erhält 0,167 g der Verbindung am 13. Februar; sie ist dauernd gesund;

Versuch Nr. 5. Eine große Ratte erhält 0,2 g der Verbindung am 13. Februar; sie ist dauernd gesund.

Versuch Nr. 6. Eine Ratte erhält ca. 0,3 g (etwas weniger) am 31. Januar. Sie ist in den nächsten Tagen krank und stirbt am 8. Februar. Sektion: Trübe Schwellung der Nieren.

Versuch Nr. 7 u. 8. Zwei Ratten erhalten 0,1 g und 0,18 g der Verbindung (chemisch rein); beide bleiben leben, doch ist die mit 0,18 g subcutan gespritzte 2 Tage krank.

Diese 8 Versuche an Ratten zeigen auch für diese Tierart eine auffallende Ungiftigkeit. Dagegen konnte durch folgende Versuche die starke Giftigkeit bisher angewandter löslicher Quecksilberverbindungen nachgewiesen werden.

Versuch Nr. 1. Eine Ratte erhält 0,02 g Sublimat (Lösung 0,5 auf 100). Die Ratte stirbt schon in der folgenden Nacht am 19. Dezember. Bei der Sektion ergibt sich hämorrhagische Nephritis.

Versuch Nr. 2. Eine große Ratte bekommt 0,04 g Sublimat einer Lösung von 0,5 auf 100 am 18. Dezember. Die Ratte stirbt noch am selbigen Tage.

Versuch Nr. 3. Eine Ratte bekommt am 24. Januar 0,02 g Quecksilberoxycyanat in 1%iger Lösung. Die Ratte stirbt noch in derselben Nacht. Die Nieren zeigen das Bild einer akuten Nephritis.

Versuch Nr. 4. Eine Ratte erhält am 24. Januar 0,02 g Hydrargyrum cyanatum in 1%iger Lösung. Tot am 25. Januar. Sektion wie Nr. 3.

Versuch Nr. 5. Eine sehr große Ratte erhält 0,05 g Asurol, d. h. 5 ccm von einer Lösung 0,1:10,0 am 8. Februar. Am 9. Februar ist sie tot.

Versuch Nr. 6. Drei Ratten erhalten 0,02, 0,03, 0,04 g Asurol in wässeriger Lösung subcutan. Alle drei Ratten gehen in 2 bis 3 Tagen zugrunde. Bei der Sektion finden sich starke Hämorrhagien im Darm und Nephritis.

Versuch Nr. 7. Eine sehr große Ratte erhält am 10. Februar 0,025 g Hydr. succinimidatum einer 1%igen Lösung. Am 11. Februar ist sie tot.

Versuch Nr. 8. Eine Ratte erhält am 1. März 0,05 g Hermophenyl, 1 ccm einer Lösung von 0,5:10,0. Sie stirbt am 2. März.

Die übrigen von mir bisher untersuchten Quecksilberverbindungen sind in Wasser unlöslich. Auch bei diesen ergibt sich eine sehr große Giftigkeit für Ratten.

Versuch Nr. 1. 0,01 g Hydrargyrum benzoicum wurde in 1 ccm Öl verrieben einer Ratte eingespritzt. Nach 3 Tagen war sie tot. Es fand sich an der Injektionsstelle eine mächtige lochartige Nekrose, die Därme waren stark injiziert und die Niere hämorrhagisch.

Versuch Nr. 2. Eine große Ratte erhält am 14. Februar 0,01 g Hydrargyrum salicyl. in Öl verrieben (2 ccm). Sie stirbt schon in der folgenden Nacht. Sektion: hämorrhagische Nephritis.

Versuch Nr. 3. Eine Ratte erhält von einer Suspension von 0,1 in 10 ccm Öl Quecksilberthymol 5 ccm, d. h. 0,05 g am 7. Februar. Am 8. Februar ist die Ratte krank, am 9. Februar ist sie tot.

Versuch Nr. 4. Eine Ratte erhält 0,05 g Kalomel in Öl subcutan, sie stirbt schon in der folgenden Nacht am 31. Januar.

Versuch Nr. 5. Eine Ratte erhält 0,02 g Hydrargyrum atoxylicum. Sie stirbt nach 2 Tagen am 16. Februar.

Der Hg-Gehalt der untersuchten löslichen Quecksilberpräparate ist folgender:

Hydrargyrum bichloratum	74 %
„ cyanatum	79 „
„ oxycyanatum	85 „
Hermophenyl (Hydrargyrumnatriumphenoldisulfat)	40 „
Asurol (Doppelsalz aus Quecksilbersalicylat und amidoxyisobuttersaurem Natrium)	40 „
Hydrargyrum succinimidatum	50 „
Diaminodiphenylmercuridicarbonsaures Natrium	38 „

Der Hg-Gehalt der untersuchten unlöslichen Quecksilberpräparate ist folgender:

Hydrargyrum salicylicum	59 %
„ thymolo-aceticum	56,9 „
„ benzoicum	43 „
„ chloratum	85 „
„ atoxylicum	32,3 „

Aus diesen Versuchen an Ratten und Kaninchen geht hervor, daß das diaminodiphenylmercuridicarbonsaure Natrium im Verhältnis zu den bisher in der Therapie verwandten Quecksilberverbindungen sehr wenig giftig ist. Es zeigt sich ferner, daß die Verbindung selbst in relativ großen Dosen, per os oder subcutan gereicht (1 g), keinen Durchfall erzeugt, daß sie also nicht einen Reiz auf den Darm ausübt, wie wir ihn bei den meisten bisher gebräuchlichen Quecksilberverbindungen sehen, wodurch deren interne Darreichung fast unmöglich

wird. Ich habe eingangs erwähnt, daß die Schmerzhaftigkeit für ein subcutan anwendbares Quecksilberpräparat von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist. Fast alle bisher gebräuchlichen Quecksilberpräparate verursachen bei der Einspritzung mehr oder minder große Beschwerden. Damit ist häufig das Auftreten von infiltrativen Prozessen verbunden. Was die Schmerzhaftigkeit anbelangt, so dürfte schon aus der Konstitution hervorgehen, daß die Verbindung kaum Schmerzen verursacht, da die Anaesthetica, z. B. Orthoform, sehr ähnlich zusammengesetzt sind. Orthoform ist p-Amidooxybenzoesäuremethylester. Infiltrationen nach unserer Quecksilberverbindung habe ich selbst bei Kaninchen, die wiederholt injiziert wurden, nicht beobachtet, und die einzige Nekrose, die ich bei Kaninchen beobachtet habe, betraf ein Tier, das früher eine Salvarsaninjektion bekommen hatte. Da das Auftreten einer solchen Nekrose nach Salvarsaninjektionen nach meinen Versuchen bei Kaninchen überaus häufig ist, so dürfte diese Nekrose sich aus der früheren Einspritzung erklären. Von größerer Wichtigkeit scheint es mir zu sein, daß ein großer Teil unserer Quecksilberverbindung auch innerlich (per os) gereicht zur Resorption gelangt, wenigstens konnte in dem Kot der Kaninchen die Verbindung bisher nach einmaliger subcutaner Injektion nicht nachgewiesen werden. Sie fand sich dagegen im Harn, und zwar, als 0,5 g per os gereicht wurden, zum großen Teil in dem innerhalb der ersten 24 Stunden gelassenen Harn, und als dem gleichen Kaninchen zum zweitenmal 1 g gegeben wurde, fand ich innerhalb der ersten 24 Stunden nur geringe Mengen, dagegen weitaus größere in dem zwischen 24 und 48 Stunden nach der Einspritzung gelassenen Harn. Diese Versuche zeigen, daß wir auch auf dem Wege per os mit Hilfe des Präparats erhebliche Quecksilbermengen in den Organismus hinein und möglicherweise zur Wirkung bringen können. Bei der Darreichung großer Dosen ergab sich, daß öfters in den nächsten 24 Stunden die Urinmenge verringert gewesen ist. Im Versuch 5 fiel sie nach der Einspritzung von 1 g auf 60 ccm in den nächsten 24 Stunden. Diese Beschränkung der Urinsekretion soll nun nicht bloß allein auf das Präparat geschoben werden. Man findet diese Erscheinung ja häufig bei Kaninchen, bei denen irgendein Eingriff vorgenommen wurde. Sie darf keines-

wegs ohne weiteres als Krankheitserscheinung aufgefaßt werden. Schon das Umsetzen aus dem Stall in den Versuchskäfig hat ja nicht selten zur Folge, daß 24 Stunden lang kein Urin gelassen wird. Daß keine erhebliche Schädigung der Nieren vorlag, bewies, daß eine nennenswerte Albuminurie nicht beobachtet werden konnte. Eine Ähnlichkeit des biologischen Verhaltens der Verbindung mit dem Atoxyl ergab sich dadurch, daß nachgewiesen werden konnte, daß die Verbindung in aromatischer Form ausgeschieden wird; aber wie groß dieser Anteil ist, ob alles in dieser Form erscheint oder nur ein Teil, das ist ebensowenig wie beim Atoxyl bisher sichergestellt. Ob auch Quecksilber in anorganischer Form aus der Verbindung abgespalten wird und in welcher Menge, konnte ebenfalls noch nicht festgestellt werden. Über die Ausscheidungsdauer ist zu sagen daß die Hauptmenge des aromatischen Komplexes innerhalb der ersten 24 Stunden im Harn erscheint, wenigstens bei subcutaner Darreichung. Bei der Darreichung per os haben wir die Hauptmenge einmal erst am 2. Tage gefunden. Wiederholte Einspritzungen scheinen eine verzögerte Ausscheidung des aromatischen Komplexes zur Folge zu haben, wie das auch beim Atoxyl von Croner und Seligmann[1]) festgestellt wurde.

Prüfung der antiseptischen Eigenschaften der Verbindung außerhalb des Tierkörpers.

a) Fäulnisversuche.

Versuch Nr. 1 und 2. 10 g Kaninchenmuskeln werden zerhackt und mit 100 ccm Wasser versetzt, dazu 1 ccm gesättigte Sodalösung. Ein 2. Versuch wird in gleicher Weise angestellt, nur unter Zusatz von 10 ccm Quecksilberverbindung (1 g Substanz auf 50 ccm Wasser). Während Versuch 1 nach 48 Stunden in Fäulnis übergegangen ist, ist Versuch 2 unverändert. Kulturen, die aus Versuch 2 auf Agar und Bouillon angelegt wurden, ergaben ein positives Resultat.

Versuch Nr. 3. 10 g Muskelfleisch vom Rind (Schabefleisch) werden mit 110 ccm Wasser versetzt, gut durchgeschüttelt und in den Brutschrank von 39° gestellt. Nach 24 Stunden ist die Flüssigkeit in intensivste Fäulnis übergegangen.

Versuch Nr. 4. Von demselben Muskelfleisch werden 10 g mit 100 ccm Wasser versetzt und 0,1 g Quecksilberverbindung, das in 10 ccm Wasser gelöst ist. Nach 24 Stunden ist keine Fäulnis durch Geruch wahr-

[1]) Croner und Seligmann, Deutsche med. Wochenschr. 1907.

zunehmen. Es zeigt sich also aus diesen Versuchen, daß die Verbindung in einer Verdünnung von 1 auf 1000 die Eiweißfäulnis hemmt.

Dagegen werden die Bakterien nicht abgetötet; es entwickeln sich in der Nährbouillon zahlreiche Mikroben, die typische Fäulnis hervorrufen können. Auch im hängenden Tropfen ließen sich in Versuch 2 und 4 zahlreiche bewegliche Stäbchen nachweisen.

b) Versuche über Milchgärung.

Versuch Nr. 1. Es wird am 28. Januar 1 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst. Davon werden 10 ccm zu 100 ccm Milch zugesetzt. Diese werden in den Brutschrank gestellt. Als Kontrolle werden 100 ccm Milch allein in den Brutschrank gesetzt. Die mit der Quecksilberverbindung versetzte Milch ist leicht gelblich gefärbt. Während nach 48 Stunden die Kontrollmilch vollständig geronnen ist und sauer riecht, ist die mit der Quecksilberverbindung versetzte Milch nicht geronnen.

Versuch Nr. 2. 100 ccm Milch werden mit 30 ccm einer Lösung der Quecksilberverbindung (1 auf 100) versetzt und im Brutschrank von 39° stehen gelassen. Zur Kontrolle werden 100 ccm Milch mit 30 ccm Wasser versetzt und ebenfalls im Brutschrank stehen gelassen. Nach 48 Stunden ist die Kontrollmilch vollständig geronnen, die mit der Quecksilberverbindung versetzte Milch ist unverändert. Aus diesen beiden Versuchen geht hervor, daß die Quecksilberverbindung in einer Verdünnung von 1 auf 300 die Gerinnung und das Sauerwerden der Milch verhindert. Dagegen enthält die Milch trotz des Zusatzes der Quecksilberverbindung lebende Keime, wie Untersuchungen im hängenden Tropfen und die Anlage von Kulturen bewiesen. Sie modifiziert also die biologische Tätigkeit der Mikroorganismen, ohne sie abzutöten.

Diaminodiphenylmercuridicarbonsaures Natrium ist also im Reagensglase kein Antisepticum, wie das Quecksilberchlorid; es kann nur das Auftreten gewisser Arten der Zersetzung (Fäulnis) hindern, tötet aber nicht die dazu befähigten Mikroorganismen.

Wenn man bedenkt, wie empfindlich Kaninchen für Quecksilber sind (0,03 g war z. B. vom Sublimat für ein Kaninchen von $2^1/_2$ kg schon die tödliche Dosis, während es von unserer Verbindung 1,0 g subcutan, d. h. über 20mal so viel Quecksilber verträgt), so müssen wir uns um so mehr über diese große Ungiftigkeit wundern, die es sowohl bei der subcutanen wie bei der intravenösen und der Darreichung per os zeigt. Diese Ungiftigkeit an Ratten, für Quecksilber weniger empfängliche Tiere, geprüft, ergibt ebenfalls eine mindestens 20mal geringere Giftigkeit als die des Sublimats (Quecksilberchlorid). Als ich vor 9 Jahren das Atoxyl in

die Medizin einführte und darauf hinwies, daß man mit ihm 20 bis 40mal mehr Arsen in den Organismus hineinbringen konnte als mit der Fowlerschen Lösung, wurde entgegengehalten, daß die Ungiftigkeit wahrscheinlich auf einer geringeren Wirksamkeit des Arsens beruhe. Dieser Einwand ließ sich damals nicht leicht widerlegen; mittlerweile hat sich gezeigt, daß er unberechtigt war, aber es stellte sich auch heraus, daß es nicht nur auf die Menge der hineingebrachten wirksamen Substanz (Arsen) ankam, sondern daß die eigenartige Bindung, die später von Ehrlich und Bertheim aufgeklärt wurde, ebenfalls einen wichtigen Faktor darstellte. Damals gab es aber für das Arsen noch kein solches Testobjekt, um die Wirkung zu prüfen, wie wir es z. B. in der Spirochaeta pallida und Spirochaeta gallinarum für das Quecksilber besitzen. Auch bei unserer Quecksilberverbindung war der Verdacht, daß das Quecksilber im Organismus nicht zur Wirkung kommt, um so mehr gerechtfertigt, als das Quecksilber in ihm vollständig maskiert ist. Sie gibt mit Schwefelammonium weder in der Kälte noch erhitzt die geringste Trübung. Mit Schwefelwasserstoff versetzt, fällt ein weißer Niederschlag aus der Lösung aus, der aber nicht schwarz wird, auch nicht beim Erhitzen. Es war daher um so wichtiger, festzustellen, ob eine solche Verbindung überhaupt noch eine spirillocide Wirkung zu entfalten vermag. Nach Versuchen von Dr. Franz Blumenthal in der Lesserschen Klinik kommt dem Präparat eine ausgesprochene spirillocide Wirkung im tierischen Organismus zu. Daraus geht hervor, daß das Quecksilber auch in dieser maskierten Modifikation zur Wirkung gelangt.

Die Wirkung der nützlichen und schädlichen Stimulatoren auf die Atmung der lebenden und abgetöteten Pflanzen.

Von

Nicolaus Iwanoff.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der St. Petersburger Universität.)

(Eingegangen am 4. März 1911.)

In der vorliegenden Arbeit unterscheide ich die Wirkung der Stimulatoren auf lebende und abgetötete Objekte, der von Prof. W. Palladin eingeschlagenen Richtung folgend, auf dessen Vorschlag auch diese Arbeit ausgeführt wurde.

W. Palladin kommt, indem er die Atmung als eine Summe von fermentativen Prozessen betrachtet, zu dem Schlusse, daß für die Erforschung dieser Prozesse zweierlei notwendig ist: einerseits diese Prozesse vom regulierenden Prinzip, als welches das Protoplasma betrachtet wird, loszulösen, und andrerseits diese Summe in ihre einzelnen Komponenten zu zerlegen. Zur Erreichung des ersten Ziels ist es notwendig, die Pflanze zu töten, d. h. das Protoplasma zu zerstören, ohne die Arbeit aller oder einiger Fermente zu vernichten. Zur Erreichung des zweiten Ziels muß man die Fermente der einzelnen Stadien von den im Organismus verlaufenden Nebenreaktionen losgelöst erhalten. Doch haben die zur Erreichung dieses letzteren Ziels gemachten Versuche bis jetzt zu keinem befriedigenden Resultat geführt; vorläufig müssen wir uns damit begnügen, einzelne Stadien aus dem Gesamtwirkungskreis auszuschalten. So erreichte W. Palladin[1]) durch Einfrieren bei 15 bis 20°C eine bedeutende Abschwächung des sekundären Oxydationsstadiums bei etiolierten Vicia-Faba-Spitzen und unterdrückte dasselbe vollständig bei Weizenkeimen. In allen Fällen, wo der Forscher den Chemismus des Atmungsprozesses ergründen will, darf er seine Versuche nicht nur auf lebende Pflanzen beschränken; abgetötete Objekte werden ihn auf Erscheinungen aufmerksam machen, die beim Arbeiten mit lebenden Pflanzen unbemerkt geblieben wären.

Bekanntlich wird die Atmung der lebenden Pflanzen nicht nur durch nützliche Nährstoffe, sondern auch durch

[1]) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1905, 240.

schädliche Stoffe (Gifte) stimuliert. Zweifellos muß eine solche Stimulation trotz der Ähnlichkeit des Endresultats in beiden Fällen dennoch ganz verschiedenartige chemische Reaktionen in der Zelle hervorrufen. Im ersten Falle ist es eine Ernährungsreaktion, und im zweiten Falle (Gifte) — eine nachfolgende Vergiftungsreaktion. An lebenden Pflanzen ist ein solcher Unterschied nicht bemerkbar. An abgetöteten Pflanzen konnte dagen in meinen Versuchen ein wesentlicher Unterschied entdeckt werden. Phosphate (nützliche Stimulatoren) üben auf die Atmung lebender Pflanzen beinahe gar keinen Einfluß aus; sie steigern aber beträchtlich die Atmung abgetöteter Pflanzen. Andrerseits beeinflussen Gifte (schädliche Stimulatoren), die die Atmung lebender Pflanzen manchmal stark stimulieren (Chinin, Urethan — nach Versuchen von W. Palladin[1]), die Atmung der abgetöteten Pflanzen entweder gar nicht oder hemmen dieselbe sehr stark.

Die Beseitigung des regulatorisch wirkenden Prinzips des lebenden Protoplasmas gibt uns die Möglichkeit, einen klaren Unterschied zwischen nützlichen und schädlichen Stimulatoren festzustellen.

I. Versuche über die Wirkung anorganischer Phosphorverbindungen.

Eine Steigerung der CO_2-Ausscheidung unter der Einwirkung von Phosphaten beobachtete Wróblewski[2]) beim Vergären von Hefepreßsaft durch Zymin. Er stellte als Optimum eine Konzentration von 1,25% Na_2HPO_4 und 1% NaH_2PO_4 fest, wobei er bemerkte, daß das neutrale Phosphat günstiger als das saure wirkt. Indem er 0,3% HCl oder 0,5% NaOH in Gegenwart des Phosphats oder ohne letzteres zusetzte, stellte er fest, daß das Phosphat eine gleichsam neutralisierende Wirkung auf die schädlichen Stoffe ausübt. Sein Schluß lautet folgendermaßen: „Die Phosphate sind regulierende Agenzien, sie nehmen die Angriffe der Säuren und Basen auf sich und garantieren so den normalen Lebenslauf in den Zellen." E. Buchner[3]) erhielt aus demselben Preßsafte eine Steigerung der CO_2-Ausscheidung von über 100% nach 20-stündiger Gärung durch Zusatz von 1,25 bis 4% Na_2HPO_4.

In seinen Versuchen vermehrte der Zusatz von K_2CO_3 ebenfalls die CO_2-Ausscheidung; er schloß daraus, daß die Zymasewirkung „durch

[1]) W. Palladin, Fortschritte der naturwissenschaftlichen Forschung 1, 253, 1910.

[2]) Wróblewski, Journ. f. prakt. Chem. 64, 1, 1901.

[3]) E. Buchner, Die Zymasegärung, S. 141.

Zusatz von schwachem Alkali beschleunigt wird". Weiter beobachteten Buchner und Antoni[1]) eine Steigerung der CO_2-Ausscheidung im Preßsaft unter der Einwirkung von Kochsaft und kamen zu dem Schluß, daß seine stimulierende Wirkung auf die Gärung durch die Gegenwart von Phosphaten bedingt sei, um so mehr, als durch Na_2HPO_4 die Gärung stärker als durch Kochsaft stimuliert wird.

Um endgültig zu beweisen, daß die Hauptwirkung des Na_2HPO_4 von der Phosphorsäure abhängt, setzten sie zum Preßsaft Lecithin zu, das eine mehr als dreifache Steigerung bewirkte.

Diese Tatsachen führten Buchner und Klatt[2]) zu dem Schluß, daß nicht die alkalische Reaktion des Natriumphosphats (wie Buchner früher dachte), sondern die Phosphorsäure selbst eine wichtige Rolle bei der Gärung spielt. Harden und Young[3]) stellten fest, daß nach dem Zusatz von alkalischem Phosphat zum Hefepreßsaft nach einiger Zeit keine Ausfällung des Phosphats durch Magnesiamischung mehr stattfindet. Sie schlossen daraus auf eine Bildung von phosphorhaltigen organischen Verbindungen. Diese phosphororganische Verbindung wurde später von ihnen[4]) und L. Iwanoff[5]) isoliert.

Letzterer beobachtete außerdem, daß die Synthese im Preßsafte ausblieb, wenn die Zersetzungsprodukte des Zuckers fehlten, die bei der Alkoholgärung gebildet werden mußten. Weiter beweist er[6]), daß ein Hexosenmolekül bei der Gärung in zwei Triosemoleküle zerfällt, die mit der Phosphorsäure zur Triosephosphorsäure synthesiert wird. Letztere wird durch Zymin oder Hefanol zu CO_2, Alkohol und einem anorganischen Phosphat vergoren. Dieses Schema wurde von Lebedew[7]) widerlegt, der zeigte, daß Iwanoff nicht Triosephosphorsäure, sondern Hexosephosphorsäure vor sich hatte. Dasselbe hatten schon früher Harden und Young[8]) behauptet. In ihrer Arbeit von 1908 stellen sie eine neue Gärungstheorie auf, in der der Phosphorsäure eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Ihre Gärungsformel lautet wie folgt:

1. $2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,R_2HPO_4 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2\,H_2O$.

Die Hexosephosphorsäure wird durch Wasser nach der Formel:

2. $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2\,R_2HPO_4$ hydrolysiert.

---

[1]) E. Buchner und Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 136, 1905.

[2]) E. Buchner und Klatt, diese Zeitschr. 1, 1908; 8, 520, 1908.

[3]) Harden und Young, Proc. Chem. Soc. 21, 189, 1905.

[4]) Harden und Young, Proc. Roy. Soc. 77, 418, 1906.

[5]) L. Iwanoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 285, 1906.

[6]) L. Iwanoff, Arbeiten der Mendelejewschen Versamml., Dez. 1907; Centralbl. f. Bakt. 24, Nr. 1/4, II. Abt.

[7]) Lebedew, diese Zeitschr. 20, 14, 1909.

[8]) Harden und Young, Proc. Roy. Soc. 80, 299, 1908; 81, 336, 1909; Centralbl. f. Bakt. 26, Nr. 6/7.

Das anorganische Phosphat wird wiederum in die Reaktion der ersten Formel hineingezogen. Die Phosphorsäure verhält sich also nach Ansicht der englischen Forscher wie ein durch seine Gegenwart auf die Zymase einwirkendes Koenzym. Aus den letzteren Formeln ist zu ersehen, daß dieser Prozeß an eine gewisse Phosphatmenge geknüpft ist, die in den Gärungskreislauf, also auch in den primären-anaeroben-Atmungsprozeß mit hineingerissen wird. Damit steht die von L. Iwanoff[1]) auf Grund der vorhandenen Tatsachen gemachte Folgerung in Einklang, wonach die Pflanze einer fortwährenden Phosphorzufuhr bedarf, solange ihr Wachstum und die Bildung neuer Organe fortdauern; später ist keine Phosphorzufuhr mehr notwendig.

Als Versuchsobjekte benutzte ich aus der Züricher Stadtmühle bezogene Weizenkeime und etiolierte Stengelspitzen von 10 bis 12tägigen Vicia-Faba-Keimlingen. S. Kostytschew hat gezeigt, daß die Weizenkeime sehr empfindlich gegen verschiedene Nährstoffe sind. Die CO_2-Menge wurde durch Absorption in Pettenkoferschen Röhren bestimmt.

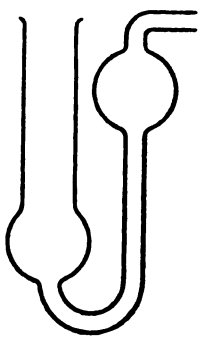


Fig. 1.

Die Weizenkeime wurden in dünner Schicht auf dickem Filtrierpapier ausgebreitet und 2 Stunden lang in 50 ccm Wasser oder einer Salzlösung, die in dünner Schicht in eine große Krystallisierschale eingegossen wurde, eingeweicht. Die mit dem Papier herausgenommenen Weizenkeime wurden vom überschüssigen Wasser auf trockenem Filtrierpapier befreit; dann wurde das Papier röhrenförmig zusammengedreht und vorsichtig in ein auf der Fig. 1 abgebildetes Gefäß übertragen.

Die feuchten Keime halten sich gut auf dem Filtrierpapier. Die Einweichmethode wurde in unserem Laboratorium von A. Richter vorgeschlagen; nach seiner Zeichnung wurde auch das abgebildete Gefäß (eine Modifikation des Chudjakowschen) angefertigt.

Das Abtöten der lebenden Objekte wurde nach der Palladinschen Gefriermethode ausgeführt.[2]) Obgleich nach den

[1]) L. Iwanoff, Über die Umsetzung des Phosphors in der Pflanze. St. Petersburg, 1905, S. 148.

[2]) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1905, 240. — W. Palladin und S. Kostytschew, Methoden zur Bestimmung der Atmung der Pflanzen. Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 3, 479.

neueren Arbeiten über das Erfrieren der Pflanzen von einem Abtöten der Pflanzen bei Temperaturen von — 15 bis — 20° (wie sie durch Vermischen von Schnee mit NaCl und NH_4NO_3 erhalten werden) nicht bestimmt die Rede sein kann, so spricht doch der Zustatz von Toluol und das Schwarzwerden der gefrorenen Stengelspitzen dafür, daß meine Objekte abgetötet waren.[1]) Lebende Hefe kann nach L. Iwanoff[2]) im Gegensatz zum Zymin und Hefanol die Zuckerphosphorsäure nicht vergären. Er erklärt das durch die Fähigkeit der lebenden Hefe, die Stoffaufnahme und den Stoffwechsel zu regulieren.

Meine Aufgabe war es, zunächst festzustellen, wie das Einführen von Phosphat in die gärende Flüssigkeit die Gärung beeinflussen wird.

Versuch 1.

4 Proben lebender Preßhefe, zu je $^1/_2$ g, vergären in 50 ccm: I. 10% Saccharose, II. 10% Saccharose + 0,5 g Na_2HPO_4, III. 10% Glucose, IV. 10% Glucose + 0,5 Na_2HPO_4.

Versuchsdauer	I. 10% Saccharose		II. 10% Saccharose + Na_2HPO_4 0,5%		III. 10% Glucose		IV. 10% Glucose + Na_2HPO_4 0,5%	
Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.
3	33,0	11,0	15,0	5,0	34,0	11,3	19,5	6,5
$18^1/_2$	—	—	—	—	—	—	—	—
3	32	10,7	33,5	11,2	37,5	12,5	41,5	13,8
4	53,0	13,2	53,2	13,4	59,0	14,7	55,0	13,2

In den letzten 7 Stunden wurde CO_2 ausgeschieden:

I. Probe	II. Probe	III. Probe	IV. Probe
85,0 mg	86,7 mg	96,5 mg	96,5 mg

Die Gegenwart von Na_2HPO_4 verminderte die CO_2-Ausscheidung der lebenden Hefe während der ersten Stunden der Gärung beinahe auf die Hälfte, infolge der Absorption der CO_2 durch das alkalische Natriumphosphat. In den letzten 7 Stunden war die CO_2-Ausscheidung in den Phosphatproben ebenso groß wie in den normalen.

[1]) Die vor kurzem erschienene Arbeit von A. Richter „Zur Frage nach dem Kältetode der Pflanzen" (Bull. de l'Acad. des Sciences de St. Petersbourg 1910, 1251) zeigt, daß die Grenze zwischen lebenden und toten Organismen ganz unbestimmt ist. Aspergillus niger, der durch eine Mischung von Äther mit fester Kohlensäure gefroren war, nahm nach dem Zurückversetzen in günstige Temperaturbedingungen (30 bis 34° C) Wachstum, Sporenbildung und energische Atmung auf. Wenn er aber nach dem Einfrieren der Zimmertemperatur (18 bis 19° C) ausgesetzt wird, so scheidet er keine CO_2 aus und verhält sich ganz wie ein toter Organismus.

[2]) L. Iwanoff, Centralbl. f. Bakt., II. Abt. 24, 1, 1909.

Der Vergleich dieses hemmenden Einflusses des Natriumphosphats auf lebendige Hefe mit den Angaben L. Iwanoffs, nach dessen oben erwähnter Arbeit Na_2HPO_4 die CO_2-Ausscheidung des Hefanols auf das 5fache steigerte, führt W. Palladin[1]) zu dem Schlusse, daß die Arbeit der Fermente in lebenden und toten Objekten offenbar verschieden verläuft. Im letzteren Falle beginnt mit „der Beseitigung des regulierenden Einflusses des Protoplasmas eine beschleunigte Umwandlung der Phosphate in Zuckerphosphorsäure". Der Eintritt von Na_2HPO_4 in lebende Hefe, wo ein bestimmter notwendiger Vorrat von Phosphorsäure vorhanden ist, „ist überflüssig und deshalb vielleicht auch schädlich."[2])

Die folgenden Versuche wurden mit Weizenkeimen ausgeführt. Darin konnte man schon a priori eine genügende Menge von anorganische Phosphate verarbeitenden Fermenten vermuten.[3]) Ich muß aber betonen, daß die in meinen Versuchen benutzten Keime allem Anschein nach abgetötet waren. Sie konnten nicht zur Keimung veranlaßt werden. 2 Portionen dieser Keime ergaben nach 3stündigem Durchleiten von Luft und Wasserstoff gleiche CO_2-Mengen; bei lebenden Keimen dagegen erhält man nach W. Palladin[4]) verschiedene Resultate. Außerdem schieden die in diesem Jahre erhaltenen Keime beinahe zweimal so wenig CO_2 aus, als die vorjährigen (1908), und die ausgeschiedene verminderte sich mit jeder Stunde, wogegen die von 1908 mit jeder Stunde intensiver atmeten. Es ist anzunehmen, daß die zuletzt erhaltenen Keime durch das Erhitzen, dem sie vor dem Versand unterworfen werden, abgetötet worden sind. Die nicht weiter bearbeiteten Keime werde ich als normale bezeichnen.

Versuch 2.

2 Portionen normaler Weizenkeime zu je 4 g wurden 2 Stunden lang in Wasser (I.) und in 1% Na_2HPO_4 (II.) eingeweicht.

Versuchsdauer Std.	Wasser CO_2 mg	Wasser CO_2 pro 1 Std.	1% Na_2HPO_4 CO_2 mg	1% Na_2HPO_4 CO_2 pro 1 Std.
2	9,0	4,5	14,7	7,3
2	7,5	3,7	11,5	5,7
2	6,7	3,3	10,5	5,2
6	23,2	3,8	36,7	6,1

Steigerung 58,1%.

[1]) W. Palladin, Eigentümlichkeiten der Fermentarbeit in lebenden und abgetöteten Pflanzen. Fortschritte der Naturwiss. Forschung 1, 253, 1910.

[2]) L. Iwanoff bemerkt allerdings in seiner letzten Mitteilung (diese Zeitschr. 25, 171), daß er in einzelnen Fällen auch bei lebender Hefe eine von der Rasse und dem physiologischen Zustande der Objekte abhängige Stimulation hervorgerufen hatte.

[3]) Diese Rolle wird dem Embryo von Hennig zugeschrieben. Botan.-Zeitg. 1904, 45.

[4]) W. Palladin, Die Atmung als Summe fermentativer Prozesse. 1907

Versuch 3.

2 Portionen Weizenkeime zu je 4 g (v. 1908), mit Aceton[1]) bearbeitet und 2 Stunden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 1% Na_2HPO_4. Nach Einsetzen der Keime in den Apparat wurden in die knieförmige Biegung der Röhre 5 bis 6 ccm Toluol eingegossen.[2])

Versuchsdauer Std.	Wasser		1% Na_2HPO_4	
	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.
$5^1/_2$	29,5	5,3	37,5	6,8
$17^1/_2$	34,0	1,9	46,5	2,6
7	9,0	1,3	17,0	2,4
18	13,5	0,7	20,0	1,1
48	86,0	1,8	121,0	2,5

Es wurde nicht mehr CO_2 ausgeschieden.

Wenn wir die CO_2 der Normalportion = 100 annehmen, so erhalten wir:

Versuchsdauer Std.	Wasser	1% Na_2HPO_4
$5^1/_2$	100	127
$17^1/_2$	100	136
7	100	177,7
18	100	148
48	100	140,7

Die Stimulation der CO_2-Ausscheidung zeigt eine fortwährende Steigerung; zu Ende der 30. Stunde erreicht sie ein Maximum von 77,7%, um später wieder auf 48% zu fallen.

Da Toluol hemmend auf die CO_2-Ausscheidung wirkt, so wurde noch folgender Versuch ausgeführt.

Versuch 4.

2 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden mit Aceton bearbeitet, 2 Stunden in Wasser (I.) und in 1% Na_2HPO_4 (II.) eingeweicht. Kein Toluolzusatz.

---

[1]) Die trockenen Keime wurden mit Aceton bedeckt; nach 24 Std. das Aceton erneuert und dasselbe 6 Tage wiederholt; dann wurden die Keime an der Luft getrocknet und von den Acetonspuren befreit. Die lebenden Keime wurden auf diese Weise getötet, wobei sie eine gewisse Menge von Lipoiden abgaben, wie das in unserem Laboratorium von Palladin und Stanewitsch gefunden wurde. Diese Zeitschr. 26, 551.

[2]) Die CO_2-Mengen in den Versuchen 2 und 3 lassen sich nicht direkt vergleichen, weil die Keime von verschiedenen Jahrgängen stammten.

Versuchsdauer Std.	Wasser CO_2 mg	Wasser CO_2 pro 1 Std.	1% Na_2HPO_4 CO_2 mg	1% Na_2HPO_4 CO_2 pro 1 Std.
$3^1/_2$	26,0	7,4	40,0	11,4
17	82,7	4,8	128,5	7,5
$20^1/_2$	108,7	—	168,5	—

Steigerung 55%.

Wenn wir berücksichtigen, daß die Weizenkeime 24% Zucker[1]) enthalten, so wird die Synthese der Phosphorsäure und darauffolgende Steigerung der CO_2-Ausscheidung auf Kosten dieser Substanz ganz wahrscheinlich. Um diese Annahme noch mehr zu stützen, mußte bewiesen werden, daß der CO_2-Überschuß bei der Phosphatportion anaeroben Ursprungs ist.

Versuch 5.

2 Portionen Aceton-Weizenkeime zu je 2 g wurden 2 Stunden in Wasser (I.) und in 2% Na_2HPO_4 (II.) eingeweicht und in einen Wasserstoffstrom gesetzt. In den Apparat wurde Toluol (5 bis 6 ccm) gegossen. Nach $20^1/_2$ Stunden wurde CO_2 ausgeschieden:

I. (norm.)	II. (2% Na_2HPO_4)
24 mg	35,5 mg

Die Steigerung betrug 47,9%.

Versuch 6.

3 Portionen normaler Weizenkeime zu je 6 g wurden I. in Wasser II. in $^1/_2$% Na_2HPO_4, III. in 2% Na_2HPO_4 eingeweicht. Nach 3 Stunden betrug die CO_2-Ausscheidung in Milligramm:

I. Portion	II. ($^1/_2$% Na_2HPO_4)	III. (2% Na_2HPO_4)
18,5	23,0	25,5

Darauf wurden die Proben eingefroren[2]) und einem Wasserstoffstrom ausgesetzt, wobei zu jeder Probe 5 bis 6 ccm Toluol zugesetzt wurden.

Versuchsdauer Std.	Wasser CO_2 mg	Wasser CO_2 pro 1 Std.	$^1/_2$% Na_2HPO_4 CO_2 mg	$^1/_2$% Na_2HPO_4 CO_2 pro 1 Std.	2% Na_2HPO_4 CO_2 mg	2% Na_2HPO_4 CO_2 pro 1 Std.
$5^1/_2$	18,5	3,36	22,0	4,0	24,0	4,36
$18^1/_2$	15,0	0,81	19,0	1,03	21,7	1,17
24	8,2	0,34	12,5	0,52	11,5	0,48
24	3,7	0,16	10,5	0,4	9,5	0,39
25[3])	3,0	0,12	8,0	0,32	7,5	0,3
97	30,0	—	50,0	—	50,2	—

[1]) Frankfurt, Die landw. Versuchsstat. 47, 464.

[2]) Das Einfrieren war in diesem Falle überflüssig, da die Keime, wie ich mich zu Ende der Arbeit überzeugte, schon abgetötet waren.

[3]) Die letzten 25 Stunden wurde Luft durchgesaugt.

Aus diesen Versuchen ersieht man, daß an den abgetöteten Keimen eine Stimulation im Wasserstoffstrome stattfand; die während der letzten 25 Stunden durchgelassene Luft ergab kein Aufflackern. In den Phosphatproben ging die CO_2-Ausscheidung viel langsamer vor sich.

Versuch 7.

Es wurden 2 Portionen normaler trockener Keime zu je 10 g genommen und in 50 ccm 5% Glucose gelegt, wobei zur II. Portion 1 g Na_2HPO_4 zugesetzt wurde.

Die CO_2-Bestimmung in Milligramm ergab:

Nach Stunden	I. (norm. Portion)	II. (2% Na_2HPO_4)
$4^1/_2$	34,25	18,0
$16^3/_4$	110,5	> 118 [1])

Die Stimulation der Hefanolgärung auf Saccharose und auch der Weizenkeime beginnt nicht sofort. In der ersten Stunde wird von der Phosphatportion weniger CO_2 als von der normalen ausgeschieden. Daraus folgt, daß jeder Zusatz von Na_2HPO_4 in allen denjenigen Fällen hemmend wirkt (Absorption der CO_2 durch das alkalische Phosphat), wo wie im I. Versuch mit lebender Preßhefe das künstlich eingeführte Phosphat nicht aufgenommen wird. Nach einigen Stunden wird nach vorübergehender Hemmung die normale Gärung wieder hergestellt. In denjenigen Fällen aber, wo eine Synthese der Phosphorsäure vor sich geht, wird der hemmende Einfluß des Phosphats nach einiger Zeit reichlich durch den Zerfall der Zuckerphosphorsäure gedeckt.

Da ich die anaerobe CO_2-Ausscheidung unter dem Einfluß des Phosphats für erwiesen hielt, wandte ich mich zur Bestimmung des Atmungsquotienten $\frac{CO_2}{O_2}$ und verfolgte seine Veränderung an normalen und Phosphatportionen.

Die Weizenkeime wurden auf dickem Filtrierpapier in dünner Schicht ausgebreitet und in einen breiten Eudiometer von 90 ccm übertragen, mit Quecksilber abgeschlossen und nach einem bestimmten Zeitraum eine Gasprobe entnommen, die im Apparat von Polowzow-Richter analysiert wurde.

Versuch 8.

2 Portionen normaler Weizenkeime zu 2 g wurden 2 Stunden I. in Wasser und II. in 1% Na_2HPO_4 (mit 1% HPO_3 neutralisiert)[2]) eingeweicht.

Nach $1^1/_2$ Stunden:

Norm.		Phosphat	
$CO_2 = 1{,}49\%$ $O_2 = 19{,}42\%$	$\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}01$	$CO_2 = 2{,}01\%$ $O_2 = 19{,}45\%$	$\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}55$

[1]) Die Barytröhre erwies sich durch 118 mg CO_2 übersättigt.

[2]) Das Neutralisieren auf Lackmus ist trotz seiner Ungenauigkeit deshalb notwendig, weil Versuche mit Na_2HPO_4 während der ersten Stunden geringere CO_2-Mengen als normale ergaben.

Dann wurde das Gas aus dem Eudiometer mehrmals ausgepumpt und dasselbe mit atmosphärischer Luft gefüllt.

Nach weiteren 3 Stunden:

Norm.		Phosphat	
$CO_2 = 1{,}21\%$ $O_2 = 19{,}71\%$	$\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}03$	$CO_2 = 1{,}62\%$ $O_2 = 19{,}87\%$	$\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}86$

Versuch 9.

2 Portionen normaler Weizenkeime zu je 4 g wurden 2 Stunden I. in Wasser und II. in 1% Na_2HPO_4, mit HPO_3 neutr. eingeweicht, 2 Stunden geatmet.

Norm.		Phosphat	
$CO_2 = 3{,}36\%$ $O_2 = 17{,}71\%$	$\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}07$	$CO_2 = 4{,}04\%$ $O_2 = 17{,}67\%$	$\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}34$

Die Menge des absorbierten Sauerstoffs steigt in den Phosphatportionen gar nicht, wogegen die CO_2-Ausscheidung und folglich auch der Atmungsquotient sich vergrößert. Diese Versuche liefern einen neuen Beweis für den anaeroben Ursprung der durch organisches Phosphat stimulierten CO_2.

Außer Versuchen mit Weizenkeimen stellte ich noch weitere mit etiolierten Bohnenstengeln (Vicia Faba) an.

Versuch 10.

2 Portionen etiolierter Bohnenspitzen zu je 13 g wurden nach W. Palladin[1]) 2 Stunden lang auf 10% Saccharose (250 ccm) kultiviert, dann I. auf 10% Saccharose, II. auf 10% Saccharose $+ 2{,}5$ Na_2HPO_4 übertragen.[2])

Nach 3 Stunden wurde CO_2 in Milligramm ausgeschieden:

I. (norm.)	II. (1% Na_2HPO_4)
25,0	25,5

Dann wurden die Pflanzen eingefroren, Toluol zugesetzt und ein Wasserstoffstrom durch den Apparat geleitet.

Versuchsdauer Std.	10% Saccharose		10% Saccharose $+ 1\%$ Na_2HPO_4	
	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.
$4^1/_2$	14,0	3,1	15,5	3,4
$17^1/_2$	12,0	0,7	17,5	1,0
22	26,0	—	33,0	—

Im Wasserstoffstrome wurde nicht mehr CO_2 ausgeschieden. Darauf wurde Luft durchgeleitet.

Nach 24 Stunden:

I. (norm.)	II. (1% Na_2HPO_4)
30,0 mg	31,25 mg

[1]) W. Palladin, Der Einfluß verschiedener organischer Nährstoffe auf die Atmung der Pflanzen, 1900.

[2]) Auf 250 ccm Lösung bezogen erhält man 1% Na_2HPO_4.

Versuch 11.

2 Portionen zu je $15^1/_2$ g eben solcher Stengelspitzen wurden für 24 Stunden in 10% Glucose gestellt, dann nach 20 Stunden I. auf 10% Glucose, II. auf 10% Glucose + 4 g Na_2HPO_4 übertragen. (Auf 200 ccm 10% Glucose erhält man dabei 2% Na_2HPO_4.)

Versuchsdauer Std.	10% Glucose		10% Glucose + 2% Na_2HPO_4	
	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.
3	38,5	12,8	33,25	11,08
2	29,5	14,7	28,0	14,0
3	41,0	13,7	42,75	14,3
8	109,0	—	104,0	—

Dann wurden die Pflanzen eingefroren und einem Wasserstoffstrom ausgesetzt. (Toluolzusatz.) CO_2 in Milligramm:

	I. (norm.)	II. (Phosph.)
Nach 24 Std.	29,0	4,70
„ $4^1/_2$ „	Spuren	—

Luftstrom durchgeleitet:

	I. (norm.)	II. (Phosph.)
Nach $18^1/_2$ Std.	44,5	41,5
„ $6^1/_2$ „	12,5	8,5
Nach 25 Std.	57,0	50,0

Es wurde nicht mehr CO_2 ausgeschieden.

Aus den Versuchen 8 bis 11 folgt:

1. Na_2HPO_4 in 1% und 2% Lösung stimuliert die Atmung lebender Stengelspitzen nicht.[1])

2. Gefrorene (abgetötete) zeigten eine entsprechende Stimulation, und zwar von 27% auf 1% und von 62% auf 2% Na_2HPO_4.

3. Die vermehrte CO_2-Ausscheidung geht auf Kosten des primären anaeroben Prozesses vor sich, weil sie im Wasserstoffstrom beobachtet wird und den Atmungsquotienten steigert (Versuche 8 und 9).

4. Das Phosphat bewirkt an abgetöteten Objekten keine CO_2-Ausscheidung im sekundären Oxydationsprozeß.

5. Diese Versuche bilden einen neuen Beweis für den genetischen Zusammenhang zwischen dem primär-

[1]) Lebende Hefe verhält sich ebenso (siehe Versuch 1).

anaeroben und dem sekundär-oxydativen Stadium des Atmungsprozesses der höheren Pflanzen.

6. Die gesteigerte CO_2-Ausscheidung kann auf keinen Fall durch die Reizwirkung des Phosphats erklärt werden, da es auch an abgetöteten Objekten beobachtet wird.

Letzterer Umstand gibt uns das Recht, die Bildung einer esterartigen Phosphor-Kohlenhydratverbindung anzunehmen, da Zuckerphosphorsäure auch in Hefepreßsaft[1]) und bei der Zymin- und Hefanolgärung erhalten wurde.[2]) Wenn die gesteigerte CO_2-Ausscheidung der lebenden Objekte als Reizvorgang auftritt, so wird die Steigerung an abgetöteten Pflanzen ausbleiben müssen. Das beobachtete auch W. Palladin[3]) an etiolierten Stengelspitzen von Vicia Faba bei Ernährung mit Zucker und salzsaurem Chinin.

L. Iwanoff beobachtete eine anaerobe CO_2-Ausscheidung an Weizenkeimen (laut seiner Mitteilung auf der XII. Versammlung russischer Naturforscher im Dezember 1909, wo ein Teil dieser Arbeit [über die Phosphate] referiert worden ist). Später veröffentlichte er die Resultate seiner Untersuchungen,[4]) wobei er nur einen Teil meiner Beobachtungen zitierte (an Vicia Faba).

Nachdem ich eine Steigerung der Atmung an den erwähnten Objekten durch Na_2HPO_4 erzielt hatte, wollte ich dasselbe Resultat durch KH_2PO_4 erreichen, doch führten alle diesbezüglichen Versuche zu negativen Ergebnissen. Wróblewski[5]) zeigte, daß das neutrale Natriumphosphat günstiger auf die Gärung einwirkt als das saure. E. Buchner und Klatt[6]) beobachteten, daß 2,5% KH_2PO_4 die CO_2-Ausscheidung beinahe um das Doppelte während der ersten 5 Stunden steigert. Sie fanden, daß 3,8% KH_2PO_4 die CO_2-Ausscheidung hemmt und 4,8% K_2HPO_4 (eine äquivalente Phosphorsäuremenge ent-

[1]) Vgl. die obenerwähnten Arbeiten von Harden und Young und Buchner.

[2]) Siehe die Versuche von L. Iwanoff.

[3]) W. Palladin, Über die Wirkung von Giften auf die Atmung. Jahrb. f. wiss. Bot. 1910, 431.

[4]) L. Iwanoff, diese Zeitschr. 25, 171.

[5]) Wróblewski, Journ. f. prakt. Chem. 64, 1, 1901.

[6]) E. Buchner und Klatt, diese Zeitschr. 8, 556, 1908.

haltend) diesen Prozeß beinahe um das Zweifache stimuliert. Ich machte zuerst Versuche mit Weizenkeimen.

Versuch 12.

2 Portionen normaler Weizenkeime zu je 6 g wurden I. in Wasser und II. in $^1/_2$ % KH_2PO_4 eingeweicht.

Nach 8stündiger Atmung:

I. (norm.)	II. ($^1/_2$% KH_2PO_4)
38,0	36,5

Versuch 13.

2 Portionen mit Aceton bearbeiteter Weizenkeime zu je 4 g wurden I. in Wasser und II. in 1% KH_2PO_4 eingeweicht und in den Apparat übertragen. Kein Toluolzusatz. Nach $4^1/_2$ Stunden wurde CO_2 in Milligramm ausgeschieden:

I. (norm.)	II. (1% KH_2PO_4)
29,0	26,5

Verminderung = 8.6%.

Versuch 14.

2 Portionen normaler Keime zu je 4 g 2 Stunden I. in Wasser und II. in 1% KH_2PO_4 eingeweicht.

Nach 5stündiger Atmung CO_2 in Milligramm:

I. (norm.)	II. (1% KH_2PO_4)
26,0	24,0

Hemmung = 8%.

Dann wurden die Objekte eingefroren und Toluol zugesetzt. CO_2 in Milligramm:

	I. (norm.)	II. (1% KH_2PO_4)
Nach $5^1/_2$ Stdn.	19,0	14,5
„ $23^1/_2$ „	20.0	8,0
Nach 29 Stdn.	39,0	22,5

Versuch 15.

2 Portionen mit Aceton bearbeiteter Weizenkeime zu je 2 g wurden 2 Stunden I. in Wasser, II. in 2% KH_2PO_4 eingeweicht (Toluolzusatz). Nach 49 Stunden CO_2 in Milligramm:

I. (norm.)	II. (2% KH_2PO_4)
43,0	13,0

Versuch 16.

Etiolierte Stengelspitzen von Vicia Faba wurden 24 Stunden auf 10% Saccharose kultiviert, dann auf 24 Stunden in 10% Saccharose mit 1% und 2% KH_2PO_4 übertragen. In allen Fällen übte das Kaliumphosphat weder auf die lebenden noch auf die abgetöteten Objekte eine merkliche Wirkung aus. $^1/_2$ bis 2% KH_2PO_4 wirkten also schädlich auf Weizenkeime und beinahe gar nicht auf Bohnenstengel. Die schädliche

Wirkung beruht auf seiner sauren Reaktion. Die Keime sind Säuren gegenüber sehr empfindlich. Selbst eine so schwache Säure wie die Gentisinsäure unterdrückt in $^1/_2$% Lösung die CO_2-Ausscheidung um 8,6%, wie das bei der Untersuchung der Einwirkung verschiedener Gifte auf die Atmung gefunden wurde (vgl. den weiteren Text).

II. Versuche mit Autolyseprodukten der Hefe.

Harden und Young[1]) machten die Beobachtung, daß autolysierter Preßsaft die Gärungsenergie des frischen Preßsaftes erhöhte. Es war deshalb wichtig, zu untersuchen, wie sich Weizenkeime und Bohnenstengelspitzen den Autolyseprodukten der Hefe gegenüber verhalten würden. S. Kostytschew[2]) fand in unserem Laboratorium, daß Weizenkeime bei der Kultur auf vollständig oder unvollständig durch Zymin vergorener Glucose im ersten Falle um 37%, im zweiten um 53% mehr CO_2 ausschieden. Diese 4 bis $4^1/_2$stündigen Versuche wurden in einem Luftstrome ausgeführt. Der Verfasser schließt daraus: „Diese Ergebnisse sprechen zugunsten der Annahme, daß Zwischenprodukte der Alkoholgärung bei der Sauerstoffatmung der Samenpflanzen tatsächlich oxydiert werden." W. Palladin[3]) fand, daß Weizenkeime in Wasserstoffatmosphäre nur um 20% weniger CO_2 als bei Luftzutritt ausscheiden. Wenn aber die Weizenkeime durch niedrige Temperatur abgetötet werden, so bleibt nur die anaerobe Atmung zurück.

Auf Grund der oben erwähnten Tatsachen führte ich folgende Versuche aus:

Versuch 17.

2 Portionen Weizenkeime (1908) zu je 4 g wurden 2 Stunden I. in Wasser, II. in Autolyseprodukten der Hefe in Wasser[4]) eingeweicht. Die CO_2 in Milligramm nach 6 Stunden betrug

I. (Wasser)	II. (Autolyseprodukte)
54,5	66,7

Dann wurden beide Portionen gefroren und einem Luftstrom ausgesetzt, wobei der untere Teil des Apparates mit Toluol beschickt wurde.

[1]) Harden und Young, Proc. Roy. Soc. 78, 1906.

[2]) S. Kostytschew, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 26a, 571, 1908; diese Zeitschr. 23, 137, 1909.

[3]) W. Palladin, Die Atmung als Summe fermentativer Vorgänge. Bull. Acad. d. Sciences 1907.

[4]) $1^1/_2$ Pfund Hefe in 1 l Wasser mit Chloroform im Überschuß 11 Tage gehalten. Dann abfiltriert und das Filtrat vor dem Versuche durch Kochen auf dem Dampfbad vom Chloroform befreit.

Nach 55 Stunden betrug die ausgeschiedene Säuremenge in Milligramm:

I. (Wasser)	II. (Autolyseprodukte)
171,0	214,7

Wenn wir die von der Wasserportion ausgeschiedene CO_2-Menge = 100 setzen, so erhalten wir:

	I. (auf Wasser)	II. (auf Autolyseprodukte)
für normale	100	123,6
für abgetötete	100	125,6

Versuch 18.

3 Portionen Weizenkeime (1908) zu je 4 g wurden 2 Stunden I. in Wasser, II. in Autolyseprodukten, III. in doppelt konzentrierter Lösung derselben Produkte eingeweicht. 3 Stunden geatmet. CO_2-Ausscheidung in Milligramm:

I. (auf Wasser)	II. (auf Autolyseprodukten)	III. (auf konz. Autolyseprodukte)
27,5	35,0	37,0

Dann wurden die Objekte gefroren und einem Wasserstoffstrome ausgesetzt. Überall wurde Toluol zugesetzt.

Versuchsdauer Std.	Wasser CO_2 mg	Wasser CO_2 pro 1 Std.	Autolyseprodukte CO_2 mg	Autolyseprodukte CO_2 pro 1 Std.	Zweimal konz. Autolyseprodukte CO_2 mg	Zweimal konz. Autolyseprodukte CO_2 pro 1 Std.
$7\frac{1}{2}$	46,5	6,2	63,0	8,4	59,5	7,9
$18\frac{5}{6}$	53,0	2,8	77,5	4,1	85,0	4,51
$26\frac{1}{2}$	47,5	1,8	57,5	2,17	72,5	2,74
$17\frac{1}{2}$	21,5	1,23	21,8	1,25	29,5	1,7
27 [1])	26	0,96	22,5	0,9	28,0	1,09
$97\frac{1}{2}$	194,5	—	242,3	—	274,5	—

Wenn wir die CO_2 der Wasserportion = 100 setzen, so erhalten wir:

	I. (auf Wasser)	II. (auf Autolyseprodukte)	III. (auf konz. Autolyseprodukte)
für normale	100	127,3	134,5
für abgetötete	100	124,6	141,1

Versuch 19.

2 Portionen etiolierter Stengelspitzen von Vicia Faba zu je 15 g wurden 2×24 Stunden auf 10% Saccharose kultiviert (nach 24 Stunden wurde die Lösung gewechselt). Dann wurde Portion I 24 Stunden auf 10% Saccharose und Portion II auf Autolyseprodukte mit Zusatz von Saccharose bis zu 10% Konzentration gehalten.

Nach 3stündiger Atmung betrug die CO_2 in Milligramm:

I. (10% Saccharose)	II. (Autolyseprodukte)
27,0	42,0

[1]) Die letzten 27 Stunden wurde Luft durchgesaugt.

Dann wurden die Objekte gefroren und in einem Luftstrom gehalten. Toluolzusatz. Nach 34 Stunden CO_2 in Milligramm:

I. (10% Saccharose)	II. (Autolyseprodukte)
44,5	50,5

Wenn wir die CO_2 der Zuckerportion = 100 setzen, so erhalten wir:

	I. (auf Saccharose)	II. (auf Autolyseprodukte)
für lebende	100	155,5
für abgetötete	100	113,5

Gesteigerte CO_2-Ausscheidung wurde in diesen Versuchen sowohl an lebenden als auch an abgetöteten Objekten beobachtet; im letzteren Falle nicht nur im Luft-, sondern auch im Wasserstoffstrome. Die Autolyseprodukte begünstigten also hauptsächlich das primäre anaerobe Atmungsstadium.

Kostytschew erhielt nach Einweichen der Weizenkeime in Wasser und vergorener Traubenzuckerlösung nach 2stündiger Atmung:

A. (Wasser)	C. (Vergorene Traubenzuckerlösung)
$CO_2 = 4{,}62\%$, $O_2 = 15{,}81\%$; $\frac{CO_2}{O_2} = 0{,}91$	$CO_2 = 5{,}42\%$, $O_2 = 16{,}88\%$; $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}53$

Ich erhielt ähnliche Resultate in meinem 8. und 9. Versuch unter der Einwirkung von Na_2HPO_4. Wenn wir berücksichtigen, daß in meinen Autolyseprodukten (und auch bei Kostytschew) anorganische Phosphate nachgewiesen werden konnten, so können wir wohl die Phosphate als wirksames Agens der Autolyseprodukte ansprechen.

III. Versuche mit Chinin.

Jacobi[1]) beobachtete eine Steigerung der Atmung bei Elodea canadensis durch Chinin. Er nahm 0,01 bis 1%. Dabei ergab 1% Chininchlorid nach 3 Stunden eine Stimulation von 20%, nach 10 Stunden sank die CO_2-Ausscheidung auf das normale Maß, und nach 22 Stunden war sie unternormal. Morkowin[2]) beobachtete ebenfalls eine Stimulation der Atmung durch Chinin (0,1%) an Vicia-Faba-Blättern, wobei der Atmungsquotient $\frac{CO_2}{O_2}$ bei der Chininportion nur wenig von der normalen abwich (norm. 0,57 bis 0,68; Chinin 0,63 bis 0,66). Frl. Grigorjew[3]) zeigte, daß Chinin die Zymase nicht stimuliert, sondern daß die größere CO_2-Summe auf der Chininportion durch ihren größeren Wirkungszeitraum erklärt wird.[4]) Weiter zeigte Frl. Smirnow, daß salzsaures Chinin, in kleinen Konzentrationen (0,05 bis 0,1%) angewandt, auf Weizen-, Erbsen-, Maissamen gar keine Wirkung ausübt; nach

[1]) Jacobi, Flora 1899, 289.

[2]) Morkowin, Rév. génér. de botan. 11, 289, 1899; 13, 109, 1901.

[3]) Grigorjew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 1904.

[4]) Das Chinin hemmt die Arbeit des proteolytischen Enzyms und schützt dadurch die Zymase.

längerer Einwirkung wird manchmal eine Verminderung der CO_2-Ausscheidung beobachtet. W. Zaleski und Reinhard[1]) haben diese Versuchsresultate bezweifelt. Sie sagen (S. 470): „Dieses Resultat erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, weil die Erbse zu den anaeroben Objekten, besonders in den ersten Stadien der Keimung, gehört, und da Chinin keine schädliche Wirkung auf die Zymase ausübt." Die Verfasser führen ihren eigenen Versuch (49) an, in dem Erbsensamen in gepulvertem Zustande der Wirkung von Chinin (0,06% oder 0,2%?) ausgesetzt wurden. Es wurde eine stündliche CO_2-Ausscheidung von 12 mg in der normalen und 13,5 mg in der Chininportion beobachtet. Aus diesem unvollständigen Versuchsprotokoll ist erstens zu ersehen, daß die Chininportion die normale nur um 1,5 mg übertrifft (was beinahe in den Fehlergrenzen liegt); zweitens ist die Schlußfolgerung der Verfasser um so unverständlicher, als ihr Versuch unter abweichenden Bedingungen ausgeführt wurde (das Objekt war zu Pulver zerrieben, also teilweise abgetötet). Es braucht nicht erst betont zu werden, daß auf Grund solcher Versuche nicht an anderen, unter abweichenden Bedingungen angestellten Versuchsresultaten gezweifelt werden darf. Was die aprioristische Behauptung der Verfasser, daß „Chinin keine schädliche Wirkung auf die Zymase ausübt", betrifft, so kann diese Ansicht nach der Arbeit von Grigorjew wohl auf die Hefezymase bezogen werden; für die höheren Pflanzen verhält sich die Sache komplizierter. So konnte ich z. B. an Weizenkeimen (ungeachtet ihrer großen Befähigung zur Anaerobiose) keine Stimulation durch Chinin erreichen; ich erhielt im Gegenteil immer eine Hemmung der CO_2-Ausscheidung.[2])

W. Palladin[3]) beobachtete an etiolierten Vicia-Faba-Spitzen eine bedeutende Zunahme der CO_2-Ausscheidung (norm. 14 mg, Chin. 34,0 mg — 9 Versuche). Nach dem Einfrieren wurde die CO_2-Ausscheidung bei beiden Portionen gleich groß. Zusatz von Pyrogallol und H_2O_2 veränderte die CO_2-Ausscheidung der Versuchsportion nicht. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß „die starke Stimulierung der Atmung durch das Chinin nicht von einer Zunahme der Peroxydasemenge begleitet ist".

Mein erster Versuch bildete eine Wiederholung derjenigen von Palladin.

Versuch 20.

2 Portionen etiolierter Faba-Stengelspitzen zu je 25 g wurden 2 Tage in 10% Saccharose kultiviert (die Lösung wurde täglich gewechselt); dann wurde die I. Portion wieder für 24 Stunden auf 10% Saccharose und II. auf 10% Saccharose + 0,1% salzsaures Chinin übertragen. Darauf wurde die während 2 Stunden ausgeschiedene CO_2 bestimmt.

I. (Kontr.)	II. (Chinin)
32,0	47,0

[1]) W. Zaleski und Reinhard, diese Zeitschr. 27, Heft 5 u. 6.

[2]) Ich nahm Chinin von Spuren bis 0,4%.

[3]) W. Palladin, Über die Wirkung von Giften auf die Atmung lebender und abgetöteter Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Botan. 1910, 431.

Dann wurden beide Portionen gefroren und nach Toluolzusatz die CO_2 bestimmt.

Nach 25 Stunden betrug die CO_2

I. (Kontr.)	II. (Chinin)
92,0	80,5

Wenn wir die CO_2-Menge der normalen Portion = 100 annehmen, so haben wir

	I. (Kontr.)	II. (Chinin)
für lebende	100	147
„ abgetötete	100	87,5

Das lebende Objekt wurde stimuliert, auf das tote dagegen wirkte das Chinin als Gift oder, wie in den Versuchen Palladins, gar nicht ein.

Versuch 21.

3 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden 2 Stunden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 0,05% salzsaurem Chinin, III. in 0,15% salzsaurem Chinin und dann beide zugefroren.

Versuchsdauer Std.	Wasser		0,05% Chinin		0,15% Chinin	
	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.	CO_2 mg	CO_2 pro 1 Std.
9	79,75	8,9	73,0	8,1	72,0	8,0
16	70,0	4,4	60,5	3,8	58,0	3,6
$6^1/_2$	18,25	2,8	15,0	2,3	14,5	2,2
$31^1/_2$	168,0	—	148,5	—	144,5	—

Wenn wir die CO_2-Menge der normalen Portion = 100 setzen, so haben wir für die abgetötete:

I. (norm.)	II. (0,05% Chinin)	III. (0,15% Chinin)
100	88,5	86

Versuch 22.

2 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden 2 Stunden eingeweicht; I. in Wasser, II. in 0,4% salzsaurem Chinin. Nach 2 St. 40 Min. wurde CO_2 in Milligramm ausgeschieden:

I. (norm.)	II. (0,4% Chinin)
24,5	18,5

Dann wurden die Objekte gefroren und ergaben nach 25 Stunden CO_2 in Milligramm:

I. (norm.)	II. (0,4% Chinin)
114,5	93,5

Die CO_2 der normalen Portion = 100 gesetzt, erhalten wir

	I. (norm.)	II. (0,4% Chinin)
für lebende	100	75,5
„ abgetötete	100	81,7

IV. Versuche mit Na_2SeO_4 Arbutin und anderen Stoffen.

Versuch 23.

3 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden 2 Stunden eingeweicht; I. in Wasser, II. in 0,2% Na_2SeO_4 III. in 0,4% Na_2SeO_4. Nach 2stündiger Atmung CO_2 in Milligramm:

I. (Wasser)	II. (0,2% Na_2SeO_4)	III. (0,4% Na_2SeO_4)
22,5	22,0	21,5

Dann wurden die Objekte eingefroren und unter Toluolzusatz wieder die Atmung untersucht.

Versuchsdauer Std.	Wasser CO_2 mg	Wasser CO_2 pro 1 Std.	0,2% Na_2SeO_4 CO_2 mg	0,2% Na_2SeO_4 CO_2 pro 1 Std.	0,4% Na_2SeO_4 CO_2 mg	0,4% Na_2SeO_4 CO_2 pro 1 Std.
$10^1/_2$	80,2	7,6	68,0	6,5	53,25	5,1
$19^1/_4$	63,0	3,3	23,5	1,2	14,75	0,77
$20^1/_2$	34,0	1,66	6,7	0,33	12,0	0,6
$50^1/_4$	177,7	—	98,2	—	80,0	—

Die CO_2 der normalen Portion = 100 setzend, erhalten wir:

	I. (norm.)	II. (0,2 Na_2SeO_4)	III. (0,4% Na_2SeO_4)
für lebende	100	98,0	96,5
„ abgetötete	100	55,3	45,0

Versuch 24.

2 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden 2 Stunden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 1% Na_2SeO_4. Nach 2 Stunden betrug die CO_2:

I. (norm.)	II. (1% Na_2SeO_4)
20,0	18,0

Beide Portionen gefroren und Toluol zugesetzt. Die CO_2-Bestimmung ergab:

Versuchsdauer Std.	Wasser CO_2 mg	Wasser CO_2 pro 1 Std.	1% Na_2SeO_4 CO_2 mg	1% Na_2SeO_4 CO_2 pro 1 Std.
$9^1/_2$	70,7	7,5	44,2	4,7
$15^2/_3$	56,75	3,6	12,0	0,8
24	23,25	0,97	5,5	0,2
49	150,7	—	40,8	—

Die CO_2 der normalen Portion = 100 setzend, haben wir:

	I. (norm.)	(II. 1% Na_2SeO_4)
für lebende	100	90,0
„ abgetötete	100	40,8

In den Versuchen 2 und 3 beginnt das Gift nach dem Abtöten der Pflanze zu wirken.

Versuch 25.

3 Portionen Weizenkeime zu je 4g wurden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 1% Arbutin, III. in 2% Arbutin.

CO_2 in 2 Stunden:

I. (norm.)	II. (1% Arbutin)	III. (2% Arbutin)
19,7	15,7	15,0

Dann wurden die Objekte gefroren und nach Toluolzusatz die CO_2 bestimmt. Nach $32^3/_4$ Stunden wurde CO_2 in Milligramm ausgeschieden:

I. (norm.)	II. (1% Arbutin)	III. (2% Arbutin)
151,0	77,0	55,7

Die Menge der CO_2 in der normalen Portion = 100 gesetzt, erhalten wir:

	I. (norm.)	II. (1% Arbutin)	III. (2% Arbutin)
für lebende	100	80	76
„ abgetötete	100	51	37

Versuch 26.

2 Portionen Weizenkeime zu je 4g wurden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 0,1% KCN.

Nach 7 Stunden CO_2 in Milligramm:

I. (norm.)	II. (0,1% KCN)
46,0	39,0

Dann wurden die Objekte gefroren und Toluol in den Apparat eingeführt.

Versuchsdauer Std.	Wasser CO_2 mg	Wasser CO_2 pro 1 Std.	0,1% KCN CO_2 mg	0,1% KCN CO_2 pro 1 Std.
7	36,5	5,2	25,5	3,6
$24^1/_2$	41,0	1,67	21,0	0,86
$31^1/_2$	77,5	—	46,5	—

Die CO_2-Menge in der Wasserportion = 100 setzend, erhalten wir:

	I. (Kontr.)	II. (0,1% KCN)
für normale	100	84,8
für abgetötete	100	66,0

Versuch 27.

2 Portionen Weizenkeime wurden 1 Stunde in Wasser eingeweicht, dann gefroren und wieder 2 Stunden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 0,2% KCN. Toluolzusatz. CO_2 in Milligramm pro 1 Stunde:

I. (Wasser)	II. (0,2 KCN)
12,0	10,25

Die CO_2-Menge der normalen Portion = 100 setzend, erhalten wir:

I. (norm.)	II. (0,2% KCN)
100	85

Versuch 28.

2 Portionen Weizenkeime, mit Aceton bearbeitet, 2 Stunden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 0,2% KCN, III. in 0,4% KCN.

Nach 6 Stunden CO_2 ausgeschieden in Milligramm:

I. (Wasser)	II. (0,2% KCN)	III. (0,4% KCN)
44,5	23,5	5,5

Die CO_2 der normalen Portion = 100 gesetzt:

I. (norm.)	II. (0,2% KCN)	III. (0,4% KCN)
100	52,8	12,4

Versuch 29.

2 Portionen etiolierter Bohnenstengelspitzen zu je 25 g wurden in 10% Saccharose 52 Stunden kultiviert, dann 21 Stunden I. auf 10% Saccharose, II. auf 10% Saccharose + 0,4% Phloroglucin gehalten.

Nach 2 Stunden CO_2 in Milligramm:

I. (norm.)	II. (0,4% Phloroglucin)
32,0	32,8

Dann wurden beide Portionen gefroren, Toluol zugesetzt und die CO_2 bestimmt.

Nach 52 Stunden wurde CO_2 in Milligramm gefunden:

I. (norm.)	II. (0,4% Phloroglucin)
92,0	90,2

In diesem Falle hat das Phloroglucin weder auf lebende noch auf abgetötete Pflanzen eine merkliche Wirkung ausgeübt.

Versuch 30.

3 Portionen Weizenkeime zu je 3 g wurden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 0,5% Phloroglucin. III. in 1% Phloroglucin.

Während der Nacht wurde die CO_2 nicht bestimmt. Am nächsten Morgen ergab die Bestimmung folgendes:

	Wasser	1/2% Phloroglucin	1% Phloroglucin
Versuchsdauer in Stunden . .	2 Std. 55 Min.	5 Std. 25 Min.	5 Std. 20 Min.
CO_2-Menge in Milligramm . .	39,5	15,5	8,0
CO_2-Menge pro 1 Stunde . . .	13,6	2,86	1,5
CO_2-Stunde auf 100 norm. . .	100	21,0	11,0

Versuch 31.

2 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden 1 3/4 Stunden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 0,5% Phloroglucin und dann gefroren.

Nach 29 1/2 Stunden betrug die CO_2-Menge in Milligramm:

I. (norm.)	II. (1/2% Phloroglucin)
115,0	25,5

Die CO_2 der normalen Portionen = 100 gesetzt:

I. (norm.)	II. (1/2% Phloroglucin)
100	22,2

Beim Vergleich dieser Daten mit denjenigen des Versuchs 9, erhalten wir CO_2 in Milligramm:

	I. (norm.)	II. ($^1/_2$% Phloroglucin)
für lebende	100	21,03
für abgetötete	100	22,2

Das Gift übte eine gleiche Wirkung sowohl auf lebende, als auch auf abgetötete Keime aus.

Versuch 32.

2 Portionen etiolierter Bohnenspitzen zu je 15 g wurden 2mal 24 Stunden in 10% Saccharose kultiviert (die Lösung wurde täglich gewechselt). Dann wurde die I. Portion in 10% Saccharose, die II. in 10% Saccharose + $^1/_2$% Gentisinsäure übertragen.

Nach 3stündiger Atmung betrug die CO_2-Menge in Milligramm:

I. (norm.)	II. (Gentisinsäure)
27,0	17,7

Dann wurden beide Portionen gefroren. Nach 34 Stunden schieden sie CO_2 aus:

I. (norm.)	II. (Gentisinsäure)
44,5	28,7

Die CO_2 der normalen Portion = 100 gesetzt, haben wir:

	I. (norm.)	II. (Gentisinsäure)
für lebende	100	65,7
für abgetötete	100	64,6

Die Gentisinsäure wirkt auf gleiche Weise sowohl auf lebende als auch auf abgetötete Stengelspitzen ein.

Versuch 33.

5 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden 3 Stunden eingeweicht; I. in Wasser, II. in $^1/_8$%, III. $^1/_4$%, IV. $^1/_2$%, V. 1% Gentisinsäure.

	Wasser	$^1/_8$% Gentisinsäure	$^1/_4$% Gentisinsäure	$^1/_2$% Gentisinsäure	1% Gentisinsäure
Versuchsdauer in Std.	$8^1/_2$	$7^2/_3$	$7^2/_3$	$25^3/_4$	20
CO_2 in Milligramm .	89,3	73,3	42,7	55,3	6,7
CO_2 pro 1 Stunde . .	10,5	9,6	5,6	2,15	0,33
Die CO_2 der normalen Portion = 100 gesetzt	100	91,4	53,3	20,5	3,2

Versuch 34.

2 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden eingeweicht: I. in Wasser, II. in 1% Gentisinsäure, mit NaOH neutralisiert:

	Wasser	1% Gentisinsäure mit NaOH neutral.
Versuchsdauer in Stunden	$3^1/_2$	$15^1/_2$
CO_2 in Milligramm	89,3	29,0
CO_2 pro 1 Stunde	10,5	1,9
Die CO_2 der normalen Portion = 100 gesetzt	100	18,1

Wenn wir die Wirkung der freien und neutralisierten Gentisinsäure vergleichen, so kommen wir zu dem Schluß, daß die saure Reaktion eine gewisse Rolle bei der Atmungshemmung spielt, daß aber außerdem ein anderer Faktor maßgebend ist, da auch die neutralisierte Säure eine Hemmung von 81,9% bewirkt.

Versuch 35.

4 Portionen Weizenkeime zu je 4 g wurden 2 Stunden eingeweicht, I. in Wasser, II. in $^1/_2$% Salicin, III. in $^1/_2$% Phlorizin, IV. in $^1/_2$% Alloxan.

Die Resultate sind in folgender Tabelle enthalten:

	Wasser	$^1/_2$% Salicin	$^1/_2$% Phlorizin	$^1/_2$% Alloxan
Versuchsdauer	4 Std.	4 Std.	5 Std. 17 Min.	5 Std. 22 Min.
CO_2 in Milligramm . . .	38,8	37,6	41,0	13,0
CO_2 pro 1 Stunde	9,7	9,4	7,8	2,5
Die CO_2 der normalen Portionen = 100 gesetzt .	100	95,7	80,4	25,8

Einwirkung von Ammoniak und von Natriumcarbonat auf verschiedene Zuckerarten in verdünnter wässeriger Lösung.

Von

Adolf Jolles.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium der DDr. M. und Ad. Jolles in Wien.)

(Eingegangen am 9. März 1911.)

Im Anschlusse an meine ausführliche Publikation über den Zerfall der Zuckerarten[1]) möchte ich noch einige Versuche bekanntgeben, die sich auf die Einwirkung von Ammoniak und von Natriumcarbonat auf Mono- und Disaccharide beziehen.

Schon Lobry de Bruyn[2]) wies darauf hin, daß Ammoniak und Alkalicarbonat analog den Hydroxyden der Alkalien auf Zuckerarten einwirken.

Mir lag aber daran, Versuche mit Ammoniak und Natriumcarbonat unter denselben Bedingungen wie mit verdünnter Lauge, also bei einer Temperatur von 37°, sehr geringer Alkalinität und sehr geringen Zuckerkonzentrationen auszuführen, wie sie für den tierischen Organismus in Betracht kommen.

Die Versuche wurden in verkorkten Kölbchen angestellt, die 24 Stunden bei 37° C stehen blieben.

---

[1]) Diese Zeitschr. 29, 152, 1910.

[2]) Vgl. E. v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten, 1904, S. 328, 713 und 835.

A. Einwirkung von Ammoniak

(vergleichsweise der Einwirkung von NaOH gegenübergestellt).

Arabinose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
NH_4OH	ca. 1	n/10	+ 5,7°	+ 4.6°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/10	+ 5,7°	+ 0°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/100	+ 6,0°	+ 4,3°	alkal.
NH_4OH	ca. 0,5	n/100	+ 2,9°	+ 2,9°	alkal.
NaOH	ca. 0,5	n/100	+ 3,05°	+ 2,3°	alkal.

Dextrose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
NH_4OH	ca. 1	n	+ 2,9°	+ 2,5°	alkal.
NH_4OH	ca. 1	n/10	+ 2,9°	+ 2,0°	alkal.
NH_4OH	ca. 1	n/100	+ 2,9°	+ 2,9°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/100	+ 3,0°	0°	sauer
NH_4OH	ca. 0,5	n/10	+ 1,5°	+ 1,0°	alkal.
NH_4OH	ca. 0,5	n/100	+ 1,5°	+ 1,5°	alkal.
NH_4OH	ca. 0,2	n/10	+ 0,6°	+ 0,5°	alkal.
NH_4OH	ca. 0,2	n/100	+ 0,6°	+ 0,6°	alkal.

Lävulose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
NH_4OH	ca. 1	n/10	− 5,4°	− 2,6°	alkal.
NH_4OH	ca. 1	n/100	− 5,3°	− 5,0°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/100	− 5,35°	− 1,0°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/10	− 5,35°	0°	alkal.

Galaktose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
NH_4OH	ca. 1	n/10	+ 4,6°	+ 3,7°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/10	+ 4,6°	0°	alkal.
NH_4OH	ca. 1	n/100	+ 4,5°	+ 4,4°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/100	+ 4,6°	+ 2,25°	alkal.

Saccharose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
NH_4OH	ca. 5	n	+ 16,0°	+ 16,0°	alkal.
NH_4OH	ca. 5	n/10	+ 17,9°	+ 17,9°	alkal.
NH_4OH	ca. 1	n/10	+ 3,6°	+ 3.5°	alkal.
NH_4OH	ca. 1	n/100	+ 3,9°	+ 3,9°	alkal.

Lactose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
NH_4OH	ca. 1	$^n/_{10}$	+3,0°	+1,5°	alkal.
NaOH	ca. 1	$^n/_{10}$	+3,0°	0°	alkal.
NaOH	ca. 1	$^n/_{100}$	+3,0°	+1,8°	alkal.
NH_4OH	ca. 0,5	$^n/_{10}$	+1,5°	+0,8°	alkal.
NH_4OH	ca. 0,5	$^n/_{100}$	+1,5°	+1,5°	alkal.

Maltose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
NH_4OH	ca. 1	$^n/_{10}$	+7,4°	+5,8°	alkal.
NaOH	ca. 1	$^n/_{10}$	+7,4°	0°	alkal.
NH_4OH	ca. 1	$^n/_{100}$	+7,5°	+7,5°	alkal.
NaOH	ca. 1	$^n/_{100}$	+8,15°	+5,4°	alkal.

Aus den Versuchen geht hervor, daß $^n/_{100}$-Ammoniak auf die Drehung von Arabinose, Dextrose, Lävulose, Galaktose und Maltose in verdünnter Lösung (0,2 bis 1%) keine Wirkung ausübt,[1]) wenn man 24 Stunden bei 37° stehen läßt, im Gegensatze zu $^n/_{100}$-Natronlauge, unter deren Einfluß die Polarisation in vielen Fällen auf 0° oder nahe 0° zurückgeht. Sogar die Einwirkung von $^n/_{10}$-Ammoniak bleibt hinter der von $^n/_{100}$-Natriumhydroxyd ziemlich zurück.

Nach Lobry de Bruyn ist die Reaktion zwischen Alkalien und Glucose, Fructose und Mannose auf die Wirkung der Hydroxylionen zurückzuführen. Die beobachtete Erscheinung ist daher leicht durch den Unterschied in der elektrolytischen Dissoziation von Ammoniumhydroxyd und Natriumhydroxyd zu erklären. Damit stimmt auch überein, daß die Drehung einer 1%igen Dextroselösung, die $^n/_1$ in bezug auf Ammoniak ist, innerhalb 24 Stunden von 2,9° nur auf 2,5° fällt, während sie in einer $^n/_{10}$-Lösung bis 2,0° zurückgeht.

Eine größere Verdünnung hat eben weitergehende Dissoziation des Ammoniumhydroxyds zur Folge.

[1]) Die geringe Abnahme der Drehung der Lävulose ist vielleicht nur auf einen übersehenen Beobachtungsfehler zurückzuführen, zumal sich die Polarisation der Lävulose mit der Temperatur stark ändert.

B. Einwirkung von Natriumcarbonat.

Dextrose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
Na_2CO_3	ca. 1	n/1	+2,9°	0°	alkal.
Na_2CO_3	ca. 1	n/10	+2,9°	+0,7°	alkal.
Na_2CO_3	ca. 1	n/100	+2,9°	+2,3°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/100	+3,0°	0°	alkal.

Maltose.

	Prozentgehalt %	Alkalinität	Polarisation am Anfang	Polarisation nach 24h	Reaktion nach 24h
Na_2CO_3	ca. 1	n/1	+7,8°	+2,4°	alkal.
Na_2CO_3	ca. 1	n/10	+7,8°	+4,6°	alkal.
Na_2CO_3	ca. 1	n/100	+7,8°	+6,7°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/100	+8,15°	+5,4°	alkal.
NaOH	ca. 1	n/10	+8,15°	0°	alkal.

Die Einwirkung von Natriumcarbonat steht gleichfalls hinter der von Natriumhydroxyd zurück, da ja auch hier die Konzentration der (infolge der Hydrolyse des Na_2CO_3 vorhandenen) Hydroxylionen eine viel geringere ist als in einer Natronlauge von gleichem Prozentgehalt.

Für den Zerfall der Zuckerarten kommt also in den verschiedenen alkalischen Körperflüssigkeiten, wie im Darmsafte und im Blute, nicht die Gesamtalkalinität, sondern die Konzentration der Hydroxylionen in Betracht, und die Feststellung dieser Größe dürfte viel beitragen zur Klarlegung des Abbaues der Kohlenhydrate im tierischen Organismus.

Untersuchungen über den Purinstoffwechsel.

VI. Mitteilung.

Über das Verhalten des Purinstoffwechsels bei Verminderung des Oxydationsprozesses des Organismus.

Von

Vittorio Scaffidi.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität zu Neapel.)

(Eingegangen am 13. März 1911.)

Neuere Untersuchungen[1]) haben gezeigt, daß die Verminderung des Oxydationsprozesses im Organismus, hervorgerufen durch Inhalation größerer Mengen von CO_2, einen bedeutenden Einfluß auf die Bildung von Harnstoff ausübt. Die Produktion des Harnstoffes zeigt sich bei Tieren unter oben angedeuteten Bedingungen beträchtlich herabgesetzt.

Danach wäre es zu vermuten, daß auch im Stoffwechsel anderer Substanzen Veränderungen eintreten können, und das speziell im Purinbasen- und Harnsäurestoffwechsel. — Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Spaltung dieser Substanzen in vitro sind hauptsächlich durch die Arbeiten von Burian[2]), Wiener[3]) und Ascoli und Izar[4]) bekannt geworden. Auf Grund dieser Untersuchungen kann man sagen, daß

1. die fermentative Spaltung des Xantins und Hypoxantins, die in vitro durch Extrakte tierischer Organe herbeigeführt wird, durch ein oxydierendes Ferment (Xantinoxydase von Burian) bedingt sei;

2. die Spaltung der Harnsäure in einfachere N-haltige Stoffe nicht eintrete oder nach dessen Beginn sogleich wieder aufhöre, wenn die

---

[1]) V. Scaffidi und V. Girone, Lo Sperimentale, 1910.

[2]) R. Burian, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43.

[3]) Wiener, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42.

[4]) Ascoli und Izar, Biochimica e terapia sperimentale 1.

Organextrakte, mit denen man experimentiert, von der Luft abgeschlossen werden (Scaffidi[1]);

3. die Extrakte gewisser Organe (Leber) imstande sind, bei Abschluß des O, aus den Komponenten, in die sie die Harnsäure in Gegenwart des O zu spalten vermögen, diese Säure wieder aufzubauen (Ascoli und Izar[2]).

Aus den Versuchen in vitro geht also hervor, daß

1. die Gegenwart von O zur fermentativen Spaltung der Purinkörper notwendig ist;

2. die Abwesenheit von O die Synthese der Harnsäure fördert, insofern als unter dieser Bedingung gewisse Organextrakte diese Säure aus bestimmten Komponenten aufzubauen imstande sind.

Die hier folgenden Versuche sind einerseits an Tieren vorgenommen worden, bei denen man annehmen kann, daß die von ihnen ausgeschiedene Harnsäure rein oxydativen Ursprungs sei (Hund), anderseits an solchen, bei denen die Harnsäure hingegen hauptsächlich, wenn nicht absolut, auf synthetischem Wege produziert wird (Ente).

I.

Die erste Versuchsreihe ist von mir an einem Hunde durchgeführt worden, der ganz purinfreie Nahrung bekam, d. h. 250 g Weißbrot und 25 g Fett pro Tag.

Einige Tage, nachdem sich beim Tiere das N-Gleichgewicht eingestellt hatte, wurden die Versuche eingeleitet, und zwar mit der Technik, wie sie bei den oben erwähnten Versuchen befolgt und beschrieben worden ist.[3]) Der Hund wurde in einen Glasbehälter gesetzt und in diesem ihm Luft mit mehr oder minder großen Mengen von CO_2 vermischt zugeführt.

Die Menge der CO_2 wurde erst jedesmal gesteigert, wenn sich beim Tiere ein gewisser Grad von Atemnot zeigte, dann wieder leicht verringert und der Versuch mit diesem CO_2-Luftgemische weitergeführt. Andere Male ließ ich das Tier in der gleichen Weise O-reiche Luft atmen. Der O wurde der Luft im Verhältnis von 50 bis 60% beigemengt.

Die Dauer der Atmung unter den beiden beschriebenen Bedingungen betrug bei jedem Versuche 3 bis 6 Stunden.

[1]) Scaffidi, diese Zeitschr. 25.
[2]) Ascoli und Izar, l. c.
[3]) Scaffidi und Girone, l. c.

Es wurde sowohl der Stoffwechsel der endogenen als auch der der exogenen Purine beobachtet, und zwar, indem man für letztere Versuche der oben angegebenen Nahrung täglich bestimmte Mengen von Harnsäure beimengte.

Versuche 1 und 2. Der erste Versuch wird nach 8tägiger purinfreier Ernährung gemacht. Der Hund wird während 3 Stunden gezwungen, in CO_2-reicher Luft zu atmen.

Versuch 2 wird einige Tage später durchgeführt und die Atmung in CO_2-reicher Luft auf 5 Stunden ausgedehnt.

Versuch 3. Der Hund atmet während 4 Stunden O-reiche Luft.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

		Harnsäure mg	Harnsäure-N mg	N der Purinbasen mg	N der gesamten Purinstoffe mg
Versuch 1. (CO_2-Atmung)	Vor dem Versuch 4 Tage	15,—	5,—	2,4	7,4
	Vor dem Versuch 3 „	14,15	4,75	0,85	5,6
	Vor dem Versuch 2 „	13,15	4,5	1,5	6,—
	Vor dem Versuch 1 Tag	15,9	5,3	1,2	6,5
	Am Tage des Versuchs .	15,6	5,2	2,8	8,—
	Nach d. Versuch 1 Tag	12,9	4,3	0,9	5,2
	Nach d. Versuch 2 Tage	14,4	4,8	—	—
Versuch 2. (CO_2-Atmung)	Vor dem Versuch 1 Tag	10,8	3,6	0,9	4,5
	Vor dem Versuch 2 Tage	16,8	5,6	1,6	7,2
	Am Tage des Versuchs .	15,—	5,—	1,6	6,8
	Nach d. Versuch 1 Tag	12,6	4,2	—	—
Versuch 3. (O-Atmung)	Vor dem Versuch 1 Tag	15,6	5,2	1,2	6,4
	Vor dem Versuch 2 Tage	16,2	5,4	1,8	7,2
	Am Tage des Versuchs .	13,8	4,6	1,2	5,8
	Nach d. Versuch 1 Tag	14,4	4,8	1,4	6,2
	Nach d. Versuch 2 Tage	12,—	4,—	0,8	4,8

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß der Stoffwechsel der endogenen Purinbasen und der Harnsäure weder durch die Atmung in CO_2-reicher noch durch die in O-reicher Luft beeinflußt wird. Die Schwankungen, die bei den Versuchen sich ergeben, halten sich immer innerhalb der Grenzen, in denen Harnsäure und Purinbasen auch unter vollkommen normalen Verhältnissen sich bewegen und zeigen sich von den Versuchen unabhängig.

Versuche 4, 5, 6. Dem Hunde werden mit dem Futter (s. oben) 7 g Harnsäure verabreicht. Bei Versuch 4 atmete das Tier unter normalen Verhältnissen; bei Versuch 5 während 4 Stunden in CO_2-reicher Luft, bei Versuch 6 während 4 Stunden in O-reicher Luft. Die Zufuhr

der CO_2- resp. O-reichen Luft beginnt jedesmal 3 Stunden nach der Fütterung, d. i. zu einer Zeit, in der die Aufsaugung seitens des Darmes schon im Gange ist. Neben der Bestimmung der Purine im Harne wurde auch die der Harnsäure im Kote vorgenommen; so konnte auf Grund dieser Bestimmung die Menge der resorbierten Harnsäure berechnet werden.

Tabelle II.

Tage der Bestimmungen	Harnsäure mg	Harnsäure-N mg	N der Purinbasen mg	N der gesamten Purinstoffe mg	
1	13,32	4,44	1,3	4,74	
2	12,3	4,1	0,8	4,9	
3	13,44	4,48	1,5	5,98	
4	44,34	13,78	1,7	14,48	Versuch 4. Man verabreicht
5	21,63	7,21	1,4	8,61	mit dem Futter 7 g Harn-
6	27,—	9,—	1,4	10,4	säure
7	15,54	5,18	1,65	6,83	
8	14,7	4,9	1,2	6,1	
9	43,35	14,45	1,8	16,25	Versuch 5. Verabreichung
10	19,74	6,58	1,3	7,88	von 7 g Harnsäure. 4h At-
11	18,66	6,22	1,8	8,02	mung in CO_2-reicher Luft
12	12,87	4,19	1,2	5,39	
13	42,96	14,32	2,2	16,52	Versuch 6. Verabreichung
14	17,1	5,7	2,28	7,98	von 7 g Harnsäure. 4h At-
15	15,6	5,2	1,4	6,6	mung in O-reicher Luft
16	12,45	4,15	1,2	5,35	

Es ist aus der Tabelle II ersichtlich, daß man nach Verfütterung von Harnsäure nur eine kleine Menge derselben im Harne wiederfindet, der größere Teil ist im Körper zerstört worden.

Bei den Versuchen 5 und 6 (CO_2- resp. O-Atmung) bleiben die Mengen der mit dem Harne ausgeschiedenen Harnsäure annähernd denen des vorhergehenden Versuches gleich: es zeigt sich also der Harnsäurestoffwechsel nicht merklich beeinflußt. Das ist noch klarer aus Tabelle III ersichtlich, in der die verfütterte Menge Harnsäure, die in den Faeces aufgefundene und das Plus der Säure im Harne gegenüber der unter normalen Verhältnissen abgegebenen Menge derselben zusammengestellt sind.

Tabelle III.

	Verfütterte Harnsäure g	Harnsäure im Kot g	Aufgenommene Harnsäure g	Plus der im Harne ausgeschiedenen Harnsäure über dem norm. Mittel g
Versuch 2.	7	0,82	6,18	0,0581
„ 5.	7	1,054	5,946	0,0437
„ 6.	7	0,94	6,06	0,0366

Es ist aus dieser Tabelle zu ersehen, daß bei den Versuchen 4, 5 und 6 6,18 g, 5,946 g und 6,06 g Harnsäure vom Körper aufgenommen worden sind und daß dagegen im Harne das Plus der Substanz gegenüber dem normalen Mittel 0,0581 g resp. 0,0437 g und 0,0366 g beträgt.

Es handelt sich also um eine so geringe Zunahme und die Werte bleiben sich bei allen 3 Versuchen so merklich nahe, daß man einen Einfluß der Versuchsverschiedenheiten nicht anerkennen kann.

II.

Die 2. Versuchsreihe ist an einer Ente vorgenommen worden, die mit purinfreiem Futter genährt worden ist (50 g Korn pro Tag). Nachdem die Ente einige Tage im Laboratorium unter diesen Futterverhältnissen gehalten worden ist, habe ich die Atmungsversuche eingeleitet. Der Kot (Faeces und Urin zusammen) von 24 Stunden wurde gesammelt, auf dem Wasserbade unter leichtem mehrmaligem Ansäuern mittels Essigsäure eingedampft, dann fein zerkleinert und auf konstantes Gewicht gebracht. An einem Teil des Materials (gewöhnlich 1 g) wurden dann die Bestimmungen der Harnsäure und des N der Purinbasen vorgenommen. Die Analysen wurden doppelt durchgeführt.

Versuche 7, 8 und 9. Bei Versuch 7 und 8 wurde die Ente gezwungen, unter einer Glasglocke während 3 Stunden in CO_2-reicher Luft zu atmen. Die Menge des der Luft beigemengten CO_2 wurde gesteigert, bis das Tier Atemnot zeigte, dann ein wenig verringert und der Versuch so weitergeführt. Bei Versuch 9 ließ ich das Tier unter der Glocke O-reiche Luft atmen; der O wurde der Luft im Verhältnis von 50% beigemengt; der Versuch dauerte 3 Stunden. Die Ergebnisse dieser 3 Versuche sind in der Tabelle IV (S. 106) verzeichnet.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die Menge der an den 2 den Versuchstagen vorhergehenden Tagen vom Tiere ausgeschiedenen Harnsäure sich auf 0,3522 g und 0,3369 g, also im Mittel auf 0,3445 g belief. An den beiden Tagen, in denen CO_2-Atmung durchgeführt wurde, stieg die ausgeschiedene Harnsäuremenge auf 0,4518 g resp. 0,3827 g. Wenn man die Werte der ausgeschiedenen Harnsäuremengen an den Tagen, in denen keine Atmungsversuche gemacht wurden, berücksichtigt, so ergibt sich ein Mittel von 0,3392 g als Wert der pro 24 Stunden ausgeschiedenen Harnsäure. Vergleicht man nun

diesen Wert mit den an den 3 Versuchstagen erhaltenen, so zeigt sich, daß bei

Versuch 7 (CO_2-Atmung während 3 Stunden) ein Plus der ausgeschiedenen Harnsäuremenge von 0,1126 g,

Versuch 8 (CO_2-Atmung während 3 Stunden) ein Plus der ausgeschiedenen Harnsäuremenge von 0,0435 g,

Versuch 9 (O-Atmung während 3 Stunden) ein Plus der ausgeschiedenen Harnsäuremenge von 0,0119 g

aufgefunden wird.

Tabelle IV.

Tage der Bestimmung	Harnsäure g	Harnsäure-N g	N der Purinbasen g	N der gesamten Purinstoffe g	N im ganzen g	
1	0,3522	0,1173	12,4	0,1297	0,3284	
2	0,3369	0,1123	14,2	0,1265	0,3444	
3	0,4518	0,1506	10,26	0,1608	0,3418	Versuch 7. 3h Atmung
4	0,3375	0,1125	13,8	0,1263	0,3306	in CO_2-reicher Luft
5	0,3333	0,1111	14,1	0,1252	0,3648	
6	0,3827	0,1275	20,9	0,1484	0,3332	Versuch 8. 3h Atmung
7	0,3428	0,1142	11,06	0,1252	0,3508	in CO_2-reicher Luft
8	0,3318	0,1106	13,2	0,1238	0,3342	
9	0,3273	0,1091	14,44	0,1235	0,3618	
10	0,3412	0,1137	12,2	0,1259	0,3462	Versuch 9. 3h Atmung
11	0,3380	0,1127	13,4	0,1261	0,3384	in O-reicher Luft

Das heißt, daß bei Atmung in CO_2-reicher (also O-armer!) Luft eine Zunahme in der ausgeschiedenen Harnsäuremenge von 0,1126 g resp. 0,0435 g eingetreten ist. Diese Plus übertreffen nun um ein gewisses die Schwankungen, die unter normalen Bedingungen in der Ausscheidung der Harnsäure zu verzeichnen sind. An Tagen, in denen die Ente O-reichere Luft geatmet hat, zeigt sich ebenfalls eine Zunahme der ausgeschiedenen Harnsäure über das mathematische Mittel; aber dieser Pluswert liegt noch innerhalb der oberen Grenze der Schwankungen in der Ausscheidung der Harnsäure, die unter normalen Bedingungen zu verzeichnen sind.

Aus den hier vorgelegten Versuchen geht also hervor, daß:

1. bei Tieren, bei denen die Bildung der Harnsäure durch oxydative Prozesse bedingt ist, bei denen der Harnsäurestoffwechsel nur einen geringen Teil des gesamten N-Stoffwechsels darstellt und eine zeitweilige experimentelle Verminderung der

oxydativen Vorgänge tiefe Veränderungen im Harnstoffe und auch NH_3-Stoffwechsel hervorrufen (Scaffidi und Girone, l. c.) kann. Diese Verminderung vermag keinerlei Einfluß auf den Stoffwechsel der Harnsäure auszuüben;

2. auch wenn die Menge der Harnsäure im Organismus durch Zufuhr derselben mit der Nahrung um ein beträchtliches erhöht wird, die Harnsäure fast gänzlich im Körper einer Zerstörung anheimfällt, und man demzufolge bei diesen Tieren eine Vorrichtung voraussetzen muß, die dazu angetan ist, größere Mengen von Harnsäure zu zerstören, selbst wenn die oxydativen Tätigkeiten der Gewebe zeitweise herabgesetzt werden;

3. bei Tieren hingegen, bei denen der Harnsäurestoffwechsel eine größere Rolle im gesamten N-Stoffwechsel spielt und bei denen die Harnsäure synthetisch aus den Spaltungsprodukten der Proteinstickstoffmoleküle dargestellt wird, eine zeitweilige Verminderung der oxydativen Prozesse des Organismus, um eine Zunahme der Harnsäurebildung zu bewirken, genügt.

4. Diese Tatsachen kann man erklären, indem man annimmt, daß durch die Versuchsbedingungen eine Hemmung des geringen uricolytischen Vermögens ihres Organismus (Wiener) eintrete, oder aber durch die Annahme, daß durch eben dieselben Bedingungen die synthetische Bildung der Harnsäure begünstigt werde.

Über die Beziehung der Infektion zu Enzymen.

Von

N. Sieber.

(Aus dem Chemischen Laboratorium des Kaiserlichen Instituts für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(Eingegangen am 14. März 1911.)

Trotzdem über die chemische Natur der Enzyme oder Fermente nicht viel Sicheres bekannt ist, können wir doch über die spezifische Wirkung dieses oder jenes Ferments urteilen und den Einfluß verschiedener Faktoren auf die fermentativen Prozesse mehr oder weniger richtig beurteilen. Allgemein bekannt sind die verschiedenen Störungen der normalen Lebenstätigkeit, die bei den fermentativen Prozessen Veränderungen hervorrufen, die wir ebenfalls bei Erkrankung des Organismus öfters beobachten können. Wir wissen, daß in der allgemeinen Lebenstätigkeit eines jeden Organismus tierischer und pflanzlicher Herkunft die fermentative Tätigkeit eine ganz bedeutende Rolle spielt und daß es sogar schwer ist, sich das Leben ohne Fermente vorzustellen. Der verschiedene und höchst komplizierte Charakter der Fermente und ihrer Funktionen ist allgemein bekannt: einerseits ihre strenge Subordination bestimmten Gesetzen gegenüber, anderseits ihr höchst labiler Charakter.

Das Studium der Enzymfunktionen während der Lebenstätigkeit ist natürlich teilweise möglich, über die Funktionsstörung aber dieses oder jenes Ferments können wir während der Lebenstätigkeit ein Urteil fällen.

Allgemein bekannt sind die Verdauungs- und Stoffwechselstörungen als Folge einer Erkrankung dieses oder jenes Organs, der Bildungsstelle bestimmter Fermente. Durch die Störung der Fermentproduktion werden verschiedene und sehr komplizierte Erscheinungen in Zusammenhang mit der spezifischen

Wirkung des teilweisen oder vollständigen Fermentverlustes hervorgerufen.

Bei verschiedenen Infektionskrankheiten können wir ebenfalls dieselben oder ähnliche Erscheinungen beobachten.

Allgemein bekannt ist das Bindungs- und das Angreifsvermögen der Fermente Toxinen und anderen bakteriellen Produkten gegenüber.

Über die Analogie zwischen diesen Gruppen und der Antikörper-, Antitoxin- und Antifermentbildung nach Einverleibung dieser oder jener Körper berichten verschiedene Forscher.

Was die Antifermente anbetrifft, so kann das Vorhandensein derselben im Organismus auf verschiedene Weise auch ohne Zufuhr des Ferments nachgewiesen werden. Von bedeutendem Interesse sind die Beziehungen der Fermente zur Immunität, zur Erzeugung derselben und den Nebenerscheinungen wie Anaphylaxie usw.

Wir sehen, daß die Infektions- und Intoxikationsfragen der fermentativen Tätigkeit sehr nahe stehen und hervorragendes Interesse bieten.

Von der zahlreichen Literatur über diese Frage will ich nur die in direktem Zusammenhang stehende, wie die Mitteilung von Clere[1]), erwähnen, der über den Lipasegehalt des Serums bei verschiedenen Infektionen berichtet hat. Die in unserem Laboratorium angestellten und vielseitigen Versuche bestätigen diese Resultate. Vor kurzem berichtete Breccia[2]) über seine Untersuchungen des Endotoxins vom Bacterium Influenzae und die Hemmung der Caseinverdauung durch Pepsin in vitro in Gegenwart dieses Endotoxins. Diese Versuche in vitro können natürlich keineswegs absolut auf die höchst verschiedenen und komplizierten Prozesse im Organismus bezogen werden, bieten aber für uns doch insofern gewisses Interesse, weil unsere in anderer Weise angestellten Versuche die Resultate von Breccia bestätigen.

Trotzdem Breccia die Untersuchungen in vitro und nicht in vivo empfiehlt, halten wir es doch für richtiger, um einen möglichst weiten Überblick über die fermentative Kraft speziell in vivo zu erhalten, nicht nur das Serum und diese und jene

[1]) Compt. rend. Soc. Biol. 53, 1131, 1901.

[2]) Centralbl. f. Physiol. u. Parasitenkunde, I. Abteil., Orig.-Bd. 57, 239.

Gewebe oder Organe, sondern die gleichzeitige Untersuchung mehrerer oder aller Organe auszuführen. Die fortgeschrittene Technik macht das gleichzeitige Austrocknen der Organe im luftleeren Raum bei niedriger Temperatur möglich, wodurch alle Organe zur Untersuchung gleichmäßig konserviert und die meisten Fermente möglichst unverändert erhalten werden.

In dieser Mitteilung will ich über mehrere in unserem Laboratorium ausgeführte und fortgesetzte Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Infektionen auf verschiedene Fermente im Organismus kurz berichten.

Bei diesen Untersuchungen stellten wir uns folgende Fragen:

1. Existiert irgendein Einfluß oder ein Zusammenhang zwischen dieser oder jener Infektionserkrankung und der allgemeinen fermentativen Tätigkeit oder der Tätigkeit einzelner Fermente im Organismus des Menschen und der Tiere?

2. Wie verhalten sich die akuten und chronischen Erkrankungen in diesem Falle?

3. Kann der spezifische Einfluß dieser oder jener Infektion auf dieses oder jenes Ferment nachgewiesen werden?

4. Wie und in welchem Maße wirken verschiedene Infektionen auf verschiedene Enzyme oder Fermente in verschiedenen Organen bei Vorhandensein irgendeines Zusammenhangs zwischen der Infektion und den Enzymen?

5. Geht der Einfluß verschiedener Infektionen immer in bestimmter Richtung vor sich, d. h. handelt es sich um bestimmte Hemmung oder um bestimmte Steigerung resp. Aktivitätssteigerung dieses oder jenes Ferments resp. um eine bestimmte Fermentfunktionsstörung?

6. Von welcher Dauer ist der Einfluß verschiedener Infektionen und Intoxikationen auf verschiedene fermentative Prozesse im Organismus?

Die Versuche wurden an mit verschieden virulenten Kulturen injizierten Kaninchen und Meerschweinchen experimentell angestellt, um verschieden schwere Erkrankungen resp. eine leichte, mittlere und akute hervorzurufen.

Zur akuten Erkrankung wählten wir den Staphylococcus aureus, zur chronischen den Tuberkelbacillus und zur Intoxikation das Diphtherietoxin. Außer dem Einfluß der Infektion und Intoxikation auf die Fermente untersuchten wir den Ein-

fluß der Fermente auf die Antifermente des Blutes resp. des Serums der Tiere, d. h. auf das Antitrypsin. Von den mit verschiedenen Kulturen oder Diphtherietoxin injizierten Versuchstieren wurde das Blut zu verschiedener Zeit auf seine fermentative Kraft untersucht. Durch dieselben Blutuntersuchungen normaler Kontrolltiere wurde die Differenz der fermentativen Kraft bestimmt. Außerdem versuchten wir aufzuklären, wie weit die Bestimmung der fermentativen Tätigkeit des Serums als Kriterium der allgemeinen fermentativen Prozesse aller und mehrerer Organe dienen kann.

Alle Fermentbestimmungen in Organen der Versuchstiere waren begleitet von denselben Bestimmungen an den entsprechenden Organen normaler Kontrolltiere.

Die Versuchs- und Kontrolltiere wurden durch Blutentnahme getötet, dann die eventuell vorhandenen pathologischen Veränderungen in den Organen festgestellt, dieselben gewogen und im Vakuum bei niedriger Temperatur getrocknet. Aus der Differenz der Fermentwirkung der Versuchs- und Kontrolltiere wurde diese oder jene Veränderung berechnet.

Wir untersuchten:

1. Von den proteolytischen Fermenten: Pepsin resp. Lab, Trypsin.
2. Von den fettspaltenden: Lipase.
3. Von den Carbohydrasen: Diastase.
4. Von den stärkespaltenden: Amylase.
5. Katalase.
6. Nuclease und einige andere Fermente, über die wir in der nächsten Mitteilung berichten werden.

Über die Versuchsmethodik und ausführlichen Resultate werden meine Mitarbeiter Dr. W. Aleschin, Dr. D. Grireff und Dr. E. Großmann in ihren Mitteilungen selbst berichten.

Über die von uns erzielten Resultate will ich hier kurz folgendes mitteilen:

1. Verschiedene Infektionen und Intoxikationen mit Diphtherietoxin beeinflussen die fermentativen Prozesse verschieden, die einen bedingen eine Steigerung, die andern dagegen eine Hemmung der fermentativen Tätigkeit.

2. Unter dem Einfluß ein und derselben Infektion können in der Tätigkeit ein und desselben Ferments in verschiedenen

Organen ganz verschiedene Veränderungen, d. h. in den einen eine Steigerung, in den anderen eine Hemmung hervorgerufen werden. Verschiedene oder gleiche Infektionen beeinflussen ein und dieselben fermentativen Prozesse in verschiedenen Organen ganz verschieden.

Von den sehr zahlreichen Resultaten über unsere Untersuchungen will ich nur die Mittelzahlen hier anführen.

Diphtherietoxin.

Der Einfluß des Diphtherietoxins auf die lipolytischen Funktionen verschiedener Organe des Meerschweinchens ist sehr verschieden.

In dem Knochenmark fand im Durchschnitt eine Steigerung von 50 bis 70% statt, in allen übrigen Organen dagegen aber eine Hemmung derselben.

Der Einfluß desselben Toxins auf die Katalasetätigkeit ist ebenfalls verschieden. In der Leber fand eine fast 3fache Hemmung statt, in der Lunge und im Herz dagegen eine Steigerung. In der Amylasetätigkeit fand in der Leber, Niere, Lunge und Gehirn eine Hemmung satt. In der Diastasetätigkeit fand in der Leber, Niere, Lunge und hauptsächlich im Gehirn eine Steigerung statt.

Staphylococcus aureus.

Eine Staphylokokkusinfektion erzeugt beim chronischen Verlauf der Erkrankung gewöhnlich eine allgemeine Steigerung der fermentativen Tätigkeit in den Organen der Kaninchen. Es findet hier eine allgemeine Steigerung der lipolytischen Tätigkeit statt, wobei dieselbe im Knochenmark ihr Maximum erreicht; dann folgen Muskel, Gehirn und Lunge. In der Katalasetätigkeit findet hier im Gehirn, der Lunge und in anderen Organen eine Hemmung, im Knochenmark und in den Muskeln dagegen eine Steigerung statt.

Die Koagulierung der Milch durch das Pepsinextrakt aus der Mucose des Magens der mit dem Staphylococcus aureus injizierten Versuchskaninchen wird stark beschleunigt.

Im Serum fand auch eine deutliche Antitrypsinsteigerung statt.

Tuberkelbacillen.

Eine Infektion mit Tuberkelbacillen erzeugt eine allgemeine Störung der fermentativen Tätigkeit. Es handelt sich hier um

eine allgemeine Hemmung der lipolytischen Tätigkeit in allen Organen der Meerschweinchen, und zwar im Knochenmark im Durchschnitt um 60%, in der Leber um 59,8%, im Gehirn um 57%, in der Lunge um 55,6%, in den Muskeln um 50,5%, in der Milz um 42,3%, im Herz um 39,5%.

In der Amylasetätigkeit fand in den Muskeln im Durchschnitt eine Steigerung um 40% statt, in der Leber um 12,9%, im Herz, im Knochenmark und in der Milz eine kaum wahrnehmbare Steigerung, in allen übrigen Organen aber dagegen eine Hemmung derselben, und zwar im Knochenmark um 29,8%, in der Lunge um 23,9%, in der Niere um 11,0%.

In der Katalasetätigkeit fand eine Hemmung statt: im Durchschnitt im Knochenmark um 42,6%, in der Lunge um 19,8%, in der Niere um 17,7%, in der Leber um 13,2%. In den übrigen Organen fand eine Steigerung statt: im Herz bis 140%, im Gehirn um 41,1%, in der Milz um 11,4%, in den Muskeln um 11,8%.

In der Nucleasetätigkeit fand eine Steigerung in folgenden Organen statt: in der Lunge um 114,5%, im Herz um 61,2%. Im Knochenmark dagegen eine Hemmung um 82,7%, in den Muskeln um 73,5%, in der Milz um 50%. In der Niere, Leber und den übrigen Organen handelte es sich um eine sehr geringe Hemmung. Die unter dem Einfluß des Bac. Pneumon. Friedländer und Bact. coli commun. hervorgerufenen Veränderungen in der fermentativen Tätigkeit sind den Störungen bei der Staphylokokkusinfektion sehr ähnlich, und die weiteren Untersuchungen werden von uns in dieser Richtung fortgesetzt, um die höchst interessante Frage über den Zusammenhang der akuten Erkrankungen einerseits und der chronischen anderseits zur Störung der fermentativen Tätigkeit aufzuklären.

Es scheint mir, daß derartige Untersuchungen uns diese oder jene Erscheinungen und Symptome an allgemeinen und lokalen Infektionserkrankungen, die oft beobachtet werden, aufklären können und für die Therapie rationelle Hinweise geben können, die von besonderem Interesse sein müssen, indem sie entweder zum Eingriff von Antifermenten oder fermentaktivierenden Körpern führen werden.

Die biochemische Seite der Kohlensäure-Assimilation durch die grüne Pflanze.

Von

Viktor Grafe.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 15. März 1911.)

Seit Aufstellung der Baeyerschen[1]) Hypothese, nach der bei der Kohlensäure-Assimilation grüner Pflanzen im Lichte Formaldehyd als primäres Assimilationsprodukt sich bildet, aus dem dann unter dem Einflusse des lebenden Protoplasma durch Polymerisation Kohlenhydrate entstehen sollen, hat die rein chemische Begründung dieser geistreichen Hypothese weitgehende Fortschritte gemacht.

Zunächst ist es gelungen, diesen Kondensationsprozeß in vitro durchzuführen, aus Formaldehyd durch Einwirkung von Alkalien Zuckerarten darzustellen[2]) und selbst Zwischenprodukte dieser Reaktion zu isolieren.[3]) Aber auch die erste Phase des hypothetischen Vorganges in der grünen Pflanze wurde mit Erfolg außerhalb des Organismus ausgeführt, also die Kohlensäure zu Formaldehyd reduziert. Zunächst allerdings in einer Weise, an deren Realisierung im lebenden Organismus kaum gedacht werden konnte,[4]) später aber auch[5]) durch Mittel, deren

[1]) A. v. Baeyer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 3, 67, 1870.

[2]) Buttlerow, Annal. d. Chem. 120, 295, 1861. — Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 15, 1632, 1882; 16, 919, 1883. — O. Loew, ebenda 20, 142, 3039, 1887; 21, 270, 1888; 22, 470, 1889. — E. Fischer, ebenda 21, 991, 1888; 23, 388, 2126, 1890.

[3]) H. und A. Euler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 39, 1906.

[4]) Jahn, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 22, 989, 1889. — Chapman Holt jun., Journ. of the chem. soc. 87, 916, 1905.

[5]) Fenton, Journ. of the chem. soc. 91, zit. nach H. Euler, Grundlagen u. Ergebn. d. Pflanzenchemie, S. 117.

Verwendung dem aktiven Protoplasma durchaus zugemutet werden kann. In die neueste Zeit fallen die Verwendung der dunklen elektrischen Entladung[1]) und verschiedener Strahlenarten[2]) zur Erzeugung von Kohlenhydraten aus Kohlensäure außerhalb des Pflanzenorganismus. Damit wären wir heute so weit, Kohlenhydrate aus Kohlensäure (und Wasserstoff) unter der Einwirkung eines kondensierenden Mittels und einer Energieform mit Zwischenbildung von Formaldehyd zu erzeugen, ja nach der neuesten bedeutungsvollen Publikation Jul. Stoklasas sogar mit Hilfe von strahlender Energie, also in größter Annäherung an den Naturprozeß. Die Baeyersche Hypothese findet in allen diesen Versuchen starke Stützen, da tatsächlich immer Formaldehyd als Zwischenprodukt aufgedeckt wurde.

Neben der Baeyerschen Hypothese wurden für die Kohlensäure-Assimilation der grünen Pflanze noch einige andere aufgestellt, die aber teils wegen der schwierigen oder unmöglichen Beweisbarkeit, teils wegen gewisser Schwierigkeiten der Vorstellung weniger Anklang fanden. Ich nenne die von Bach[3]), die neben Formaldehyd die Perkohlensäure als Zwischenprodukt der Assimilation annimmt, ferner die von Crato[4]), die von der Orthokohlensäure ausgehend zunächst zu Hexaoxyhydrobenzol, einer dem Inosit isomeren hypothetischen Substanz, gelangt, jene von Usher und Priestley[5]), die neben Formaldehyd auch Wasserstoffsuperoxyd als Zwischenprodukte ansehen und die Wirkung eines Enzyms bei der Kohlensäureassimilation postulieren, eine Annahme, die sich der jener Forscher nähert, die die Assimilation ganz und gar als einen vom lebenden Plasma unabhängigen Fermentprozeß angesehen wissen wollen.[6])

[1]) Brodie, Proc. Roy. Soc. 22, 172, 1874. — Losanitsch und Jowitschitsch, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 30, 136, 1897. — de Hemptinne, Chem. Centralbl. 1897 II, 1045. — Solvay, ebenda 1898 II, 421. — W. Loeb, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 3593, 1904; Zeitschr. f. Elektrochemie 11, 745, 1905; 12, 282, 1906; Landw. Jahrb. 1906, 541. — Ruß, Zeitschr. f. Elektrochemie 12, 412, 1906. — J. Rülf, Zeitschr. f. allgem. Physiol. 6, 493, 1907.

[2]) J. Stoklasa und W. Zdobnický, Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Anwesenheit von Kaliumhydroxyd, in Abwesenheit von Chlorophyll. Sitzungsber. d. Wien. Akad. 119, Abt. IIb, 1910. — Dieselben, Photochem. Synthese d. Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll. Diese Zeitschr. 30, 434, 1911. Daselbst auch ausführliche Literaturangaben.

[3]) A. Bach, Compt. rend. 1893, 116; 1894, 118.

[4]) Crato, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 25, 1892.

[5]) Usher und Priestley, Proc. Roy. Soc. 77, 78, 1906.

[6]) S. Fußnote 1 S. 116.

Formaldehyd als Zwischenprodukt und die Mitwirkung naszierenden Wasserstoffs nimmt auch G. Pollacci[1]) an, dem wir vielleicht die ersten ausgedehnten biochemischen Versuche zur Kohlensäure-Assimilation verdanken, während Étard[2]) dem Carotin eine große Rolle zuschreibt, das als ungesättigter Kohlenwasserstoff sich mit den Elementen der Kohlensäure verbindet und immer höhere mehrwertige Alkohole aufbaut.

Während die Baeyersche Hypothese also nach der rein chemischen Seite eine weitgehende Stütze erfuhr, wurde die biochemische Beweisführung etwas in den Hintergrund gerückt; die Möglichkeiten des Experiments sind hier allerdings dadurch sehr eingeschränkt, daß Formaldehyd für die Zellen der lebenden Pflanze ein starkes Gift vorstellt, das schon in großer Verdünnung tödlich wirkt. Man kann also einerseits nicht erwarten, größere Mengen Formaldehyd aus assimilierenden Pflanzen zu gewinnen, wenn dieser wirklich als Zwischenprodukt auftritt, sondern muß annehmen, daß er augenblicklich weiter polymerisiert wird, oder mit W. Loeb die Annahme machen, daß gar nicht Formaldehyd in Substanz bei der Assimilation auftritt, sondern labile Gruppen, die in ihrer tautomer stabilen Form Formaldehyd vorstellen, zum Zuckeraufbau zusammentreten, so daß also eine Giftwirkung durch „Formaldehyd" überhaupt nicht zustande käme; andrerseits kann man bei der Prüfung, ob Formaldehyd ein für die grüne Pflanze assimilables Element vorstelle und etwa substituierend für Kohlensäure eintreten könne, der Pflanze nur sehr geringe Mengen des giftigen Stoffes zumuten.

Daß Formaldehyd tatsächlich aus assimilierenden Pflanzen gewonnen werden kann, selbst wenn man diesen nicht wie in den Versuchen von Usher und Priestley als Zersetzungsprodukt des Chlorophylls anzusehen gezwungen ist, wurde namentlich von Pollacci[1]) in einer Reihe ausführlicher Untersuchungen gezeigt, und auch von anderen Forschern wurde diese Frage in bejahendem Sinne entschieden.[3]) Allerdings wird man W. Löb darin zustimmen müssen, daß dieser in Substanz gewinnbare Formaldehyd größtenteils als Nebenreaktion der normalen Kohlensäure-Assimilation zu betrachten ist. Tatsächlich kann man ihn auch nur in Spuren nachweisen, Spuren aber, die bei verdunkelt gehaltenen grünen Pflanzen nicht auftreten. Mit Hilfe eines sehr empfindlichen, spezifischen Reagens für Formaldehyd[4]) ist es mir ebenfalls gelungen, solchen in assimilierenden Pflanzen nachzuweisen,[5]) ein Befund, der ganz neuerdings von E. Senft in Stoklasas (l. c.) Laboratorium bestätigt worden ist. Gleichzeitig konnte gezeigt werden,[5]) daß höchstwahrscheinlich dem Kalk,

[1]) G. Pollacci, Estr. d. Atti dell' Ist. bot. dell' università di Pavia 8, 1902; 7, 1899; Rend. d. R. Acc. dei Lincei 16, 1907.

[2]) Étard, La biochimie et les chlorophylles, Paris 1906.

[3]) Delépine, Compt. rend. 123, 120, 1896. — Euler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 3412, 1904. — Plancher und Ravenna, Rend. d. R. Acc. dei Lincei 13 II, 459, 1904. — Kimpflin, Compt. rend. 144, 148, 1907.

[4]) V. Grafe, Österr. botan. Zeitschr. 1906, Nr. 8.

[5]) Grafe und v. Portheim, Sitzungsber. d. Wien. Akad. 115, 1906.

bekanntlich ein unentbehrlicher Nährstoff der höheren Pflanze, oder einem anderen basenbildenden Element eine sehr wichtige Rolle beim Kondensationsprozeß der Kohlensäure zukomme. Nach Stoklasa (l. c.) ist es das in Bildung begriffene Kaliumbicarbonat, das unter der Einwirkung nascierenden Wasserstoffs und der ultravioletten Strahlen die Zuckerbildung aus CO_2 katalysiert. Mit dieser von chemischer Seite festgestellten Tatsache stimmt auch eine im physiologischen Experiment aufgefundene gut überein, auf die ich hier hinweisen möchte: Kürzlich hat Molisch (Sitzungsber. d. Wien. Akad. 18, Abt. I, 1909; 19, Abt. I, 1910) gezeigt, daß grüne Wasserpflanzen Mangan und Eisen in ihre Membranen, bzw. auf denselben einlagern können, wobei die charakteristische Einlagerung von Manganoxyd nur im Lichte erfolgt und auch die Eisenablagerung durch das Licht verstärkt wird, bzw. ebenso wie die von Mangan strenge vom Licht abhängig ist. Ferner wurde von Hassack (Molisch, l. c. S. 10) gezeigt, daß Wasserpflanzen während der Assimilation im Licht Phenolphthalein röten, die Rötung bei Nacht wieder verschwindet. Das ist auf eine Alkaliausscheidung während der Assimilationstätigkeit zurückzuführen, durch das Alkali auch künstlich auf den Zellwänden erzeugte Berlinerblauniederschläge gelöst und farblos gemacht werden. Auch die Mangan- und Eisenoxydablagerung ist auf diese Alkaliausscheidung zurückzuführen. Molisch hat eine große Reihe von Wasserpflanzen auf ihre Fähigkeit, im Licht ein Phenolphthalein rötendes Alkali auszuscheiden, geprüft. Hassack meint, daß die Pflanze während der Assimilation im Lichte kohlensaures Alkali abscheidet und daß dieses die Kalksalze als Carbonat fällt, das sich als Kalkinkrustation an den Pflanzen absetzt. Ferner zeigte er, daß die Wasserpflanzen den gelösten Alkalibicarbonaten einen Teil der Kohlensäure zu entziehen und diesen zu assimilieren vermögen, wodurch eine Überführung der Bicarbonate in die neutralen Salze bewirkt wird.

Es liegt nun nahe, sich vorzustellen, daß das Phenolphthalein rötende, bei der Kohlensäureassimilation sich bildende Alkali etwa Kaliumcarbonat ist, das in statu nascendi als Bicarbonat die Assimilation der Kohlensäure bewirkt und dann als fertig gebildetes, unwirksam gewordenes Salz ausgestoßen wird, wodurch auch das Ausbleiben der Alkaliausscheidung bei Nacht erklärt wäre (s. a. O. Loew, Worauf beruht die alkalische Reaktion, die bei Assimilationstätigkeit von Wasserpflanzen beobachtet wird? Flora 77, 419, 1893).

Hinsichtlich der zweiten einschlägigen Frage, ob der Formaldehyd von der grünen Pflanze zum Aufbau der Kohlenhydrate verwendet werden kann, sind in erster Linie die Versuche von Loew[1]) und Bokorny[2]) zu nennen, in denen gezeigt wurde,

[1]) O. Loew, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 22, 482, 1889; Centralbl. f. Bakt. 1892, Nr. 14.

[2]) Th. Bokorny, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 9, 103, 1891; Pharm. Centralhalle 43, 204, 1902; Arch. f. d. ges. Physiol. 125, 467, 1908; ebenda 128, 565, 1909.

daß die weniger giftigen Derivate des Formaldehyds, formaldehydschwefligsaures Natron, Methylal von Spirogyren zur Stärkebildung Verwendung finden können. Daran schließen sich Bokornys Versuche, nach denen Spirogyren aus fortgesetzt zugeführten Spuren von freiem Formaldehyd Stärke auch im Dunkeln zu bilden vermögen, so daß die für die Assimilation unbedingt notwendige Energie des Lichtes für die erste Phase, die Reduktion von Kohlensäure zu Formaldehyd, nicht aber für dessen Kondensation ein unentbehrliches Agens zu sein scheint. Daß Formaldehydderivate von entstärkten Algen zur Stärkebildung Verwendung finden können, scheint auch nach (noch nicht veröffentlichten) Versuchen des Autors mit Hexamethylentetramin, das als Urotropin in der Heilkunde Verwendung findet, sich zu bestätigen. Tréboux[1]) konnte zeigen, daß Elodea noch $^5/_{100}{}^0/_{00}$ Formaldehyd in wässeriger Lösung gut verträgt, und Bouilhac[2]) stellte bei Sinapis alba eine gewisse Resistenz dieser Pflanze gegen Formaldehyd fest, der nach Bouilhac und Giustiniani[3]) bei ungenügender Beleuchtung als Nährstoff dienen kann, wenn er zur Nährlösung in geringer Menge zugesetzt wird, während bei Phaseolus vulgaris ein solcher Zusatz (Grafe und v. Portheim, l. c.) das Wurzelsystem und damit auch die oberirdischen Organe schwer schädigt.

Von allen den genannten Autoren wurde der Formaldehyd dem Kulturmedium (Erde oder Nährlösung) zugesetzt, den wachsenden Pflanzen also von den Wurzeln aus zur Verfügung gestellt. Nun ist es aber eine Tatsache, daß Formaldehyd nicht nur ein intensives Gift gegen Bakterien und Pilze vorstellt,[4]) sondern auch chlorophyllose Organe, Wurzeln, Samen[5]) heftig schädigt; dazu kommt noch, daß die käufliche $40\,^0/_0$ige Formollösung häufig 5 bis $8\,^0/_0$ Methylalkohol, ferner die brenzligen

[1]) Tréboux, Flora 1903, 73.

[2]) Bouilhac, Compt. rend. 133, 751, 1901; 135, 1369, 1902.

[3]) Bouilhac und Giustiniani, Compt. rend. 1903, 1155, zit. nach Botan. Centralbl. 1903 II, 219.

[4]) Geuther, Ber. d. pharm. Ges. 5, 325, nach Grafe u. v. Portheim, l. c. S. 2. — F. Cohn, Jahresber. d. schles. Ges. f. vaterl. Kultur 1895, II. Abt. naturw.-botan., Sekt. S. 23, nach Botan. Centralbl. 1902 II, 109.

[5]) R. Windisch, Botan. Centralbl. 1898, 339; Landw. Versuchsstat. 1901, 241.

Produkte der trockenen Destillation des Holzes enthält, die in Berührung mit den Pflanzenwurzeln selbst in weitgehender Verdünnung dieselben schädigen können.

Nun ist ja aber der Formaldehyd ein Gas, das ohne weiteres vom Luftvolumen des Kulturgefäßes aus den grünen Blättern zur Verfügung gestellt werden kann, die zweifellos zur Aufnahme und Verarbeitung dieses Gases besser angepaßt sein dürften als die chlorophyllosen Wurzeln. Überdies muß berücksichtigt werden, daß in wässerigen Formollösungen ein Gleichgewicht zwischen monomolekularem und trimerem Formaldehyd besteht, für welche beide die Möglichkeit der Hydratation in Betracht gezogen werden muß, durch die z. B. aus dem monomolekularen Aldehyd das Methylenglykol

$$HCOH + H_2O = CH_2\begin{matrix}OH\\OH\end{matrix}$$

entstünde[1]). Nun würde — für die Annahme der Hydratation spricht der geringe Partialdruck des Formaldehyds in wässeriger Lösung — der Körper $CH_2(OH)_2$ den vorhandenen Analogien nach sehr viel weniger unbeständig und flüchtig sein als der eigentliche Aldehyd HCOH mit seiner durch die doppelte Bindung bedingten Spannung im Molekül; dadurch muß aber naturgemäß auch sein Zerfall in die oben erwähnten labilen Gruppen und damit seine Polymerisierbarkeit zu höheren Molekülen beeinträchtigt, die Giftwirkung des wässerigen Formols aber befördert werden.

Auf Grund dieser Überlegungen wurden (seit 3 Jahren) Versuche angestellt, die die Einwirkung gasförmigen Formaldehyds auf die grüne Pflanze klarstellen sollten.[2]) Der Pflanze wurde ein bestimmtes Volumen Formaldehydgases zur Verfügung gestellt und nach Ablauf des Versuches durch quantitative Analyse ermittelt, ob und wieviel Formaldehyd aufgenommen worden war. Für die ersten Versuche wurde entsprechend verdünntes, käufliches Formol, für die späteren reines, aus

[1]) Auerbach, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amte 22, 584, 1905; Chem. Centralbl. 1905, 1081.

[2]) V. Grafe und L. Ritter v. Portheim, Österr. Botan. Zeitschr. 1909, Heft 1. — V. Grafe und Emmy Vieser, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 27, Heft 7, 1909. — V. Grafe, ebenda 29, Heft 2, 1911.

Merckschem Paraformaldehyd gewonnenes Gas benutzt, mit dem destilliertes Wasser gesättigt wurde.[1]) Nach einer kritisch vergleichenden Durchprüfung der verschiedenen für die quantitative Bestimmung des Formaldehyds vorgeschlagenen Methoden wurde die Oxydationsmethode von Romijn[2]) gewählt, die die Eigenschaft des Formaldehyds benutzt, in alkalischer Lösung zu Ameisensäure oxydiert zu werden, worauf man nach beendeter Einwirkung ansäuert und das ausgeschiedene Jod in bekannter Weise durch Natriumthiosulfat zurücktitriert. Namentlich in der Fresenius-Grünhutschen Abänderung[3]) ist dieses Verfahren zur Feststellung sehr kleiner Formaldehydquantitäten, worauf es ja hier ankommt, sehr brauchbar.[4])

Durch eine Reihe blinder Versuche wurde zunächst versucht, das Formaldehydquantum eines Luftvolumens ohne Pflanzen in der Weise zu bestimmen, daß unter eine genau 8000 ccm fassende, auf eine Glasplatte gut aufgeschliffene, am aufruhenden Rande eingefettete Glocke ein Kulturglas mit 250 ccm dest. Wassers und daneben eine Uhrschale mit 10 ccm einer 2%igen Formaldehydlösung gestellt wurde. Die oben tubulierte Glocke war mittels eines gut paraffinierten Korkstöpsels verschlossen, der zwei Bohrungen trug; durch die eine führte eine Glasröhre bis auf den Boden der Glocke, durch die andere eine solche knapp unter dem Glockenhals endigende, beide außerhalb des Gefäßes rechtwinklig abgebogen, mit Kautschukschlauch und Klemmschraube versehen. Nachdem die Glocke samt Inhalt 8 Tage bei konstanter Temperatur gestanden hatte, wurde das längere Ableitungsrohr mit einer Schwefelsäurewaschflasche, das kürzere mit drei als Waschflaschen montierten und mit je 30 ccm $^n/_{10}$-NaOH gefüllten Schüttelflaschen verbunden. Nun wurde mehrere Stunden ein langsamer Luftstrom mittels eines Aspirators durch die Glocke geschickt, so daß der Formaldehyd des Luft-

[1]) Es hatte sich nämlich gezeigt, daß die Verunreinigungen des käuflichen Formols die Pflanze, die ja solchen Einflüssen gegenüber fabelhaft empfindlich ist, schädigen und in der Entwicklung Pflanzen gegenüber, denen reiner Formaldehyd geboten worden war, mitunter stark zurückbleiben lassen.

[2]) Romijn, Zeitschr. f. analyt. Chem. 36, 18, 1897.

[3]) Zeitschr. f. analyt. Chem. 44, 13, 1905.

[4]) Wijne, Chem. Centralbl. 1903, 397. — Vanino, ebenda 1258. — Male, ebenda 1905, 273.

volumens in den Waschflaschen mit NaOH sich hätte finden müssen; es war aber auch nach mehrstündigem Absaugen keine Spur des Gases in die vorgelegte Lauge gegangen.[1]) Da auf diese Weise die Bestimmung des im Glockenvolumen vorhandenen Formaldehyds nicht möglich ist, wurden zwei wie vorher montierte, genau gleich große Glocken nebeneinander aufgestellt, nach Abbruch des Versuches das Kondenswasser von der Glockenwand abgespritzt und die vom Kulturgefäß aufgenommene und die im Uhrglas zurückgebliebene Formaldehydmenge quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, daß für eine bestimmte Temperatur der aus der Lösung in das Luftvolumen verdampfte Betrag an Formaldehyd eine konstante Größe ist (Grafe und v. Portheim, l. c., S. 7). So ist es möglich, aus dieser Konstanten und der Differenz des zurücktitrierten Formaldehyds die Menge des in den Pflanzen, die man unter einer Glocke zieht, verbliebenen Formaldehyds zu bestimmen. Vorsichtshalber wurde aber stets für jeden Versuch auch noch ein blinder, ohne Pflanzen, jedoch sonst unter denselben Versuchsbedingungen aufgestellt, so daß die Konstante für jeden Versuch separat bestimmt werden konnte. Bei den Vorversuchen zeigte es sich, daß das Kultursubstrat, die Erde, und damit die Wurzeln der Pflanze sehr sorgfältig vor dem Eindringen des Formaldehyds geschützt werden mußten. Das nächstliegende war, mit Nährlösungen zu arbeiten und diese mit einer indifferenten Flüssigkeit, etwa neutralem Vaselinöl, zu überschichten; die Versuche mißlangen aber, da die Keimlinge, infolge Verwendung des Vaselinöls, auch ohne Formaldehyd, wohl infolge Sauerstoffmangels der Wurzel, abstarben. In der Folge wurden Gartentöpfe verwendet, die außen glasiert waren und am Boden keine Öffnung für den Abfluß des Wassers trugen. Die Erde wurde mit Leitungswasser hinlänglich durchfeuchtet und mit einer Lage Stanniolpapier sorgfältig bedeckt, für das Andrücken des Metalls an den Innenwulst des Topfes und darüber hinaus an dessen Außenwand wurde Sorge getragen. In einer Reihe von Vorversuchen, für die die ziemlich resistenten Blätter von Epheuzweigen benutzt wurden, konnte festgestellt werden, daß die äußerste Menge Formaldehyd, die ohne Schä-

[1]) S. a. Plancher und Ravenna, Rend. d. R. Acc. dei Lincei CCCII, 5; 13, 2. Sem. 1904, 459 nach Grafe und v. Portheim, l. c.

digung der Pflanze noch Anwendung finden durfte, zwischen 0,4‰ und 0,65‰ Formaldehyd im Luftvolumen lag. Die folgenden Versuche wurden ausschließlich mit Keimpflanzen von Phaseolus vulgaris angestellt, die Samen nach dem Anquellen auf nassem Filtrierpapier zum Keimen gebracht, die Würzelchen in die Löcher gesteckt, die mittels einer Stricknadel in Erde und Stanniolddecke gebohrt worden waren, die noch verbleibenden Lücken sorgfältig mit neutralem weißem Vaselin verschmiert. Die so adjustierten Töpfe wurden in mäßiges Licht ins Warmhaus gestellt, wo die Keimlinge sich entwickelten und ergrünten. Nun wurde ein Topf in eine der Glocken gebracht, in der sich gleichzeitig eine Schale mit Wasser zum Feuchterhalten des Raumes und das Gefäß mit einer entsprechenden Menge Formol befanden, aus der Formaldehydgas an das Luftvolumen abgegeben werden sollte. Später traten dann auch Versuche dazu, in denen die Pflanzenkulturen bloß mit Formaldehyd, aber bei Ausschluß von Kohlensäure gezogen wurden, die durch ein Gefäß mit konzentrierter Ätzkalilösung aus dem Glockenvolumen absorbiert wurde. Außer dem blinden Versuch zur Ermittelung der Konstanten befand sich auch stets eine gleich große Glocke mit normalen und mit kohlensäurefrei, aber ohne Formaldehyd gezogenen Pflanzen neben den eigentlichen Versuchsobjekten. Schon aus den ersten Versuchen (die Zahlen vgl. in Grafe und v. Portheim, l. c.) ging hervor, daß Formaldehyd von den verwendeten Pflanzen in weit höherer Konzentration ohne jegliche Schädigung ertragen wird, als dies von Tréboux für Elodea festgestellt worden war, denn dort konnten noch 0,0005% HCOH gut ertragen werden, während dies hier noch bei einem Gehalte von 0,04%, also der 80fachen Quantität der Fall war. Was den Habitus der Versuchspflanzen nach Abbruch des Versuches betrifft, so erschienen die Hypokotyle der Formolpflanzen gegen die der Normalpflanzen verkürzt, die Epikotyle etwas verlängert, die Primordialblätter der ersteren meist größer, länger und breiter, die Blattbasis weit weniger stark ausgebuchtet. Für die späteren Versuche wurden größere, 14550 ccm fassende Glocken verwendet, die durch paraffinierte Korkstöpsel luftdicht verschlossen waren. Wiederholt wurde auch die Kulturerde daraufhin geprüft, ob Formaldehyd eingedrungen war, aber stets mit negativem Er-

folg, wie übrigens auch die gute Entwicklung und rein weiße Farbe der Erdwurzeln bewies, während Nebenwurzeln, die zufällig über die Stanniolddecke emporgewachsen waren, und der Wurzelhals, der etwa über das Vaselin in die Formolatmosphäre hineinragte, sofort Bräunung oder wenigstens braune Flecken zeigte. Die verwendete Formollösung war vorher genau eingestellt und eine bestimmte Menge davon unter beide Glocken (die Versuchsglocke und in die pflanzenlose, zur Ermittelung der Konstanten bestimmte) gebracht, und nach Ablauf des Versuches der vom Wasser in der Schale aufgenommene und der im Formolgefäß zurückgebliebene Formaldehyd wieder maßanalytisch bestimmt; die Differenz war jene Menge, die ins Luftvolumen entwichen war, das Plus der größeren Differenz unter der Kulturglocke war auf die Aufnahme seitens der Pflanzen zu beziehen. Naturgemäß wurden die Pflanzenkulturen mit Wasser in das Formaldehyd-Bestimmungsgefäß abgespritzt, um auch den im Kondenswasser gelösten Formaldehyd zu gewinnen.

Zunächst handelte es sich immer darum, festzustellen, welche Formolkonzentrationen von den betreffenden Versuchsobjekten gerade noch ohne Schädigung vertragen wurden. Da zeigte es sich, daß die Aufnahme des Formaldehyds durch die Pflanze durchaus nicht direkt von der im Luftvolumen befindlichen Menge abhängig war, sondern je nach der Individualität der Pflanze, nach dem Entwicklungsstadium und nach den herrschenden Licht- und Temperaturverhältnissen sehr bedeutende Schwankungen zeigte. Namentlich der letztere Umstand zeigte sich sehr auffallend darin, daß von Anfang April an die Schädigungsgrenze durch Formaldehyd immer tiefer herabrückte, so daß die eben ohne Schädigungen vertragene Formolmenge vom Mai ab etwa halb so klein war als die vom Dezember bis März. Im allgemeinen wurde maximal 1 mg Formaldehyd pro Pflanze, also von der in einem großen Gartentopf befindlichen Kultur von 20 Pflanzen 0,02 g Formaldehyd aus der Luft aufgenommen. Die winterliche Grenzkonzentration betrug 40 ccm einer 2,5%igen Lösung (0,968 g Formaldehyd), wovon ca. 0,6 g in die Luft übergegangen und 0,4 bis 1 mg per Pflanze verbraucht worden waren. Die Schädigungen durch giftig wirkende Formaldehydkonzentrationen

sind sehr charakteristisch: braune Flecken und Streifen an der Unterseite der Blätter und am Stengel, mikroskopisch wahrnehmbares Zusammenballen und Bräunung der Chloroplasten, Herausfallen kleiner abgestorbener Partien der Blattspreite, so daß diese wie perforiert aussah; sehr bemerkenswert ist auch bei sonst scheinbar guter äußerer Entwicklung das Hohlwerden des Stengels durch rasche Resorption des Markes in noch sehr jugendlichen Entwicklungsstadien. Solche Schädigungen traten im Mai schon durch 35 ccm einer 2,5 %igen Lösung ein. Um dem Einwand zu begegnen, daß der Formaldehyd hauptsächlich als Reiz wirke und dadurch die raschere Mobilisierung der Reservestoffe aus den Kotyledonen bewirke, wodurch das durchschnittlich raschere Wachstum der Formolkulturen erklärt wäre, wurden in der Folge die Bohnenkeimlinge nach 3 bis 4tägiger Entwicklung mittels einer scharfen Schere ihrer Kotyledonen beraubt und dann erst in die betreffende Kultur genommen. In den meisten Fällen gelang es auch hier, die Pflanzen großzuziehen, und diese Versuchsmethodik wurde in der Folge ausschließlich verwendet, um den Zeitraum der Kultur zu verlängern. Um zu vermeiden, daß etwa organische Substanzen der Kulturerde auf das bessere Gedeihen der Pflanze hinwirkten, und zwar in den Formolkulturen infolge Reizwirkung des Aldehyds stärker als in den Normalkulturen, wurde in einer ganzen Reihe von Versuchen statt der Gartenerde mit Königswasser gewaschener Quarzsand als Kulturmedium verwendet und mit Leitungswasser begossen, jedoch ohne Änderung der früher gewonnenen Versuchsergebnisse. Ferner wurden kotyledonenlose Pflanzen ganz ohne Kohlensäure über konzentrierter Kalilösung mit Formaldehyd im Luftvolumen gezogen. Solche Pflanzen entwickelten sich ganz normal, erschienen sogar größer und besser entwickelt als die normal mit Kohlensäure kultivierten Pflanzen, während die Kulturen, denen weder Kohlensäure noch Formaldehyd geboten worden war, meistenteils frühzeitig zugrunde gingen. Die Versuchsanordnung war hier die, daß in einer großen Schale, die den Durchmesser der Kulturglocke besaß, 500 ccm KOH 2:3 sich befanden, in welche Flüssigkeit ein Becherglas mit der dargebotenen Formolmenge und ein umgestürztes Glasgefäß eingesenkt war, auf das eine Krystallisierschale mit Wasser gestellt wurde (dies zur Feuchterhaltung des

Glockenraumes); auf dieser Schale befand sich erst das Kulturgefäß mit den Pflanzen.

Wenn Formaldehyd von der Pflanze wirklich im Wege der Assimilation aufgenommen worden war, mußte eine Vermehrung ihres Trockengewichtes konstatiert werden können. Diese Versuche gestalteten sich äußerst schwierig und mühsam, vor allem deshalb, weil Pflanzen ohne Reservestoffe sich nur sehr langsam entwickeln und länger andauernde Kulturen in der hermetisch geschlossenen Glocke sich wegen des bald eintretenden Sauerstoffmangels und der Austrocknung der Erde verboten. Die Phaseoluskulturen konnten daher im allgemeinen überhaupt nicht länger als 3 Wochen unter den Glocken mit Formaldehyd gezogen werden; nach dieser Zeit gingen sie zugrunde, während sich ihre Blätter gelb verfärbten, und zwar in der Regel einige Tage vor den Normalkulturen. Bei Phaseolus vulgaris ist erfahrungsgemäß eine Zunahme der Trockensubstanz nicht vor dem 20. Kulturtage zu erwarten, indem vorher die Verluste durch Atmung die Trockengewichtszunahme überwiegen. Es wurde daher regelmäßig in normalen sowohl als in den Formolkulturen ein Minus des Pflanzentrockengewichtes gegenüber dem der verwendeten Samen erhalten, ein Minus aber, das bei den Formaldehydkulturen durchschnittlich kleiner war als in den normalen oder gar in den kohlensäurefrei gezogenen Kulturen, so daß man indirekt auf eine Zunahme des Trockengewichtes auf Kosten des Formaldehyds schließen darf. Die Verwertbarkeit des Formaldehyds und dessen Kondensation zu Glykogen im tierischen Organismus wurde von K. Grube[1]) nachgewiesen.

Bei allen diesen Versuchen ist der Einwand möglich, daß die Pflanze im Lichte die von ihr bei der Atmung abgegebene Kohlensäure direkt im Assimilationswege verarbeitet, so daß eigentlich nur Kohlenhydratbildung im Dunkeln aus Formaldehyd für dessen Assimilierbarkeit einen schlagenden Beweis abgeben könnte, wie dies kürzlich in den zitierten Versuchen von Bokorny mit Spirogyren geschehen ist.

Dahin abzielende Versuche mit gasförmigem Formaldehyd lieferten jedoch folgende Resultate:

---

[1]) K. Grube, Arch. f. d. ges. Physiol. 121, 636, 1908; 126, 585, 1909.

Im Dunkeln wird von grünen Pflanzen überhaupt kein Formaldehyd aufgenommen, wie die quantitative Bestimmung zeigte. Daß aber dem Chlorophyll eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung des Formaldehyds zukommt, bewies schlagend folgendes Experiment: Den Dunkelkulturen wurden 10 ccm einer 2,5%igen Lösung, also eine im Lichte durchaus unbedenkliche Quantität, zur Verfügung gestellt. Die Pflanzen entwickelten sich ganz normal mit dem bekannten Habitus der etiolierten Pflanzen. Nach einigen Tagen der Dunkelkultur wurde die Glocke ans Licht gestellt, und schon nach wenigen Stunden zeigten sich braune Punkte an den gelben Blättern und braune Streifen an den etiolierten Stengeln, die bekannten Schädigungen des Formaldehydgiftes. Das Chlorophyll scheint es also zu sein, das die relative Resistenz grüner Organe und Organismen gegenüber chlorophyllosen Organen und Pilzen, Bakterien usw. bedingt. Im Lichte beginnt die Stoffwechseltätigkeit der etiolierten Pflanzen mächtig einzusetzen, es fehlt aber an Chlorophyll, um den Formaldehyd zu verarbeiten, und dieser muß als Gift wirken. Über die Art und Weise, wie das Chlorophyll entgiftend wirkt, kann man sich verschiedene Vorstellungen machen, sei es, daß es den Aldehyd in seine tautomeren labilen Gruppen spaltet, die dann sofort weiter zu Kohlenhydraten polymerisiert werden, sei es, daß es nach der Annahme von Löb als leicht oxydabler Stoff den Sauerstoff aus dem System entfernt, so daß dessen Vereinigung mit Wasserstoff und damit die Bildung des giftigen Wasserstoffsuperoxyds vermieden wird.

Daß übrigens der Formaldehyd nicht nur als Reizstoff wirkt, sondern in der Pflanze auch noch eine andere Rolle spielt als solcher, ergaben zahlreiche Versuche, in denen den Kulturen die verschiedensten Quantitäten Acetaldehyd, Essigsäure, Salicylaldehyd vom Luftvolumen aus geboten wurden, die aber schon in äußerst geringen Mengen Wachstum und Entwicklung der Pflanzen verhinderten oder diese zum Absterben brachten.

In einigen Fällen zeigte sich, daß trotz guter Entwicklung der Versuchspflanzen in der Formaldehydatmosphäre auffallend wenig Stärke von denselben ausgebildet wurde, die (diese Versuche sind bisher nur in den Wintermonaten angestellt worden)

makrochemisch gar nicht nachzuweisen war, während die Samen, aus denen die Pflanzen gezogen worden waren, makrochemisch deutlich sichtbare Stärke enthalten. Unter dem Mikroskop enthielten nur die Stengel in der Stärkescheide größere Quantitäten Stärke, während in der Blattlamina nur sporadisch Stärkekörnchen zu sehen waren. Da der Formaldehyd aber verwertet worden war, erschien die Frage naheliegend, ob nicht ein anderes Kohlenhydrat als Stärke bei der Kondensation des Formaldehyds entstanden war. Der Extrakt der geernteten Pflanzen wurde nach vorsichtigem Trocknen bei 50° und Ausziehen mit 30%igem Alkohol auf Zucker geprüft.[1]) Die Untersuchung von normalen und kohlensäurefrei mit Formaldehyd gezogenen Pflanzen wurde stets parallel vorgenommen. Die folgenden Zahlen beziehen sich auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern in 10 ccm der betreffenden Flüssigkeit und sind stets für dasselbe Trockengewicht berechnet:

	Formaldehydpflanzen	Normalkultur
Versuch vom 4. XII. 1910	38,5 mg	18 mg
„ „ 27. XII. 1910	29,3 „	8 „
„ „ 11. I. 1911	42,0 „	19 „
„ „ 25. I. 1911	33,0 „	13 „

Die in Formaldehydatmosphäre kultivierten Pflanzen wiesen also regelmäßig einen weitaus größeren Zuckergehalt auf. Erfahrungen über eine Ansammlung von Abbauprodukten der Polysaccharide und Eiweißstoffe bei Einwirkung von Narkotica auf die Pflanze liegen bereits mehrfach vor.[2]) Sie beruht darauf, daß durch den Einfluß der Narkotica (ebenso wirken nach eigenen Erfahrungen wohl die meisten Gase, die für die Pflanze nicht indifferent sind) die synthetisierenden Vorgänge gehemmt oder aufgehoben sind, während die abbauenden noch weiter fortschreiten. Das kann entweder damit zusammenhängen, daß diejenige Formation im Plastid, der die Synthese obliegt,

[1]) Nach J. Bang, diese Zeitschr. 2, 271, 1906.

[2]) W. Johannsen, Kgl. Danske Vidensk. Selskabs Shriften 6th R. nat.-math. Afdeling 8, 1897, nach Naturwiss. Wochenschr. vom 30. November 1902, Heft 9. — Reinhard und Suschkow, Beihefte z. Botan. Centralbl. 18, 133, 1905. — Butkewitsch, diese Zeitschr. 10, 314, 1908. — Prianischnikow, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 22, 35, 1904. — Puriewitsch, nach Euler, l. c. S. 236.

labiler ist und schneller zu funktionieren aufhört, oder daß die Enzyme des Aufbaues weniger resistent gegen schädigende Einflüsse sich verhalten als die des Abbaues, oder endlich, wenn man Synthese und Abbau als den Ausdruck von Gleichgewichtsverschiebungen eines durch einen und denselben Katalysator beeinflußten reversiblen Vorganges auffaßt, daß durch Einwirkung der genannten Gase das Gleichgewicht nach der Seite der Abbauprodukte hin verschoben wird. Auf eine Diskussion dieser hypothetischen Vorgänge möchte ich mich hier um so weniger einlassen, als die zu berücksichtigenden Möglichkeiten in H. Eulers: Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie 3, 235ff., und bei Butkewitsch l. c. erschöpfend in sehr lesenswerter Weise behandelt sind.

Daß es sich aber im vorliegenden Fall vielleicht um die Wirkung eines Enzyms handelt, darauf deutet das Ergebnis folgenden Versuchs: Der Preßsaft der frischen und der wässerige Auszug der bei 50° getrockneten Pflanzen wurde mit einigen Kubikzentimetern 2%igen Stärkekleisters zusammengebracht. In beiden Fällen gab der mit dem Safte der normalen Pflanzen zusammengebrachte Stärkekleister schon nach wenigen Stunden keine oder nur rote Reaktion mit Jod, während die Zuckermenge beträchtlich zugenommen hatte. Der Preßsaft der Formolpflanzen dagegen hatte auch nach 24 Stunden, was die Stärkereaktion anlangt, den zugesetzten Stärkekleister kaum zu verändern vermocht. Es ist also jedenfalls die Wirksamkeit der stärkeverzuckernden Amylase durch den Formaldehyd herabgesetzt worden. Nun wirkt aber dieses Gas offenbar noch anders als Äther, Chloroform, Toluol usw., es wird assimiliert, in Kohlenhydrat umgewandelt, was man sich nach den vorliegenden Arbeiten (Stoklasa, l. c.) als eine von Enzymwirkung unabhängige, bloß durch die Gegenwart von Alkali bewirkte Synthese vorstellen kann. Aber die weitere Synthese zu Stärke, offenbar eine Enzymwirkung, gelingt nicht mehr. Diese Erwägung, im Einvernehmen mit der Tatsache, daß die Amylase durch Formaldehyd in ihrer Wirksamkeit ebenfalls zum Teil gestört wird (auch die Kotyledonen, wenn sie den Pflanzen belassen worden waren, wurden viel langsamer in der Formaldehydatmosphäre aufgebraucht, als dies normalerweise der Fall ist, und waren noch nach dem 14. Kulturtage mit Stärke

dicht gefüllt), könnte vielleicht in der Weise gedeutet werden, daß die Amylase nicht nur bei dem Stärkeabbau, sondern auch bei deren Synthese eine Rolle spielt. Wie dem auch sei, der von den Formolpflanzen aus Formaldehyd gebildete Zucker wird von denselben nur zum geringsten Teil zu Stärke aufgebaut, sondern wahrscheinlich direkt bei den Wachstumsvorgängen aufgebraucht, worauf auch das durchschnittlich bessere Gedeihen der Formolpflanzen in der ersten Zeit des Versuches zurückzuführen sein dürfte. Denn mit der Zeit führt dieser ungewohnte Assimilationsmodus im Einvernehmen mit dem eintretenden Sauerstoffmangel zur Schädigung und schließlich zum Zugrundegehen der Pflanzen. Phaseolus vulgaris verhält sich in der Formaldehydatmosphäre also ebenso wie die sog. Zuckerpflanzen Scilla, Hyacinthus und eine Reihe unserer Frühlingspflanzen, die bei der Kohlensäureassimilation ebenfalls keine Stärke, sondern wahrscheinlich reduzierenden Zucker bilden, worauf auch hier das schnellere Wachstum zurückzuführen sein dürfte.

Es ist bisher noch nicht in befriedigender Weise gelungen, Amylasenpräparate aus dem Versuchsmaterial herzustellen, weil dazu jedenfalls Versuche in viel größerem Maßstabe angestellt werden müssen. Dieses Ziel und das Studium der Abhängigkeit der Formaldehydassimilation von Lichtstärke und -farbe, von Temperatur, die Änderungen im Gaswechsel, der Einfluß der mineralischen Nährstoffe usw. soll bei der Fortsetzung dieser Versuche in erster Linie ins Auge gefaßt werden.

Die Bestimmung des Eisens auf colorimetrischem Wege.

(Eisengehalt der Kuhmilch.)

Von

Hilary Lachs und H. Friedenthal.

(Aus dem Privatlaboratorium von Dr. H. Friedenthal, Nicolassee-Berlin.)

(Eingegangen am 17. März 1911.)

Die Bestimmung des Eisens in einer Säuregemischaschenlösung nach Neumann ist fraglos, nach vielfachen Erfahrungen, den älteren Methoden überlegen: sie liefert die genauesten und zuverlässigsten Resultate. Beachtet man aber, daß die meisten Organflüssigkeiten, wenn überhaupt, nur wenige Milligramme Eisen im Liter enthalten, so leuchtet ein, daß bei Benutzung der Neumannschen Methode viel Untersuchungsmaterial zur Verfügung gestellt werden muß. Hierdurch wird ein großer Aufwand an Zeit und Arbeit bedingt.

Der eine von uns (Friedenthal) hat, um obige Übelstände zu beheben, eine colorimetrische Methode der Bestimmung des Eisens angegeben, die in gemeinsamer Arbeit geprüft wurde. Die neue Methode erlaubt wegen ihrer bisher unerreichten Empfindlichkeit, mit wenigen Kubikzentimetern der betreffenden zur Untersuchung stehenden Flüssigkeit — in unserem Falle mit Kuhmilch — unvergleichbar rascher, jedoch ebenso genau wie mit der Neumannschen Methode, die Eisenbestimmung vorzunehmen.

Prinzip. Die blutrote Färbung, die bei der umkehrbaren Reaktion $Fe''' + 3(CNS)''' \rightleftarrows Fe(CNS)_3$ auftritt, rührt von dem undissoziierbaren $Fe(CNS)_3$ her und erreicht in Anwesenheit eines Überschusses von $(CNS)'''$ ein Maximum an Intensität bei einer bestimmten Konzentration von H^+-Ion. Wenn man die Flüssigkeit mit Äther ausschüttelt, so entfernt man Ferrirhodanid, das im nichtdissoziierten Zustande in Äther löslich ist. Der vorhandene nichtdissoziierte Teil geht daher zunächst größtenteils in den Äther über; es bildet sich neue undissoziierte Verbindung in der wässerigen Lösung, die wieder in den Äther

übergeht, und nach Erreichung des schließlichen Gleichgewichtes ist mehr nichtdissoziiertes $Fe(CNS)_3$ im Äther vorhanden als vorher in der wässerigen Lösung. Die Folge ist eine sehr beträchtliche Steigerung in der Empfindlichkeit der Reaktion. Stellt man sich eine Reihe ätherischer Lösungen von $Fe(CNS)_3$ aus sukzessiv verdünnteren, genau bekannten Eisenlösungen her, so ist in dieser Reihe eine Lösung vorhanden, deren Farbenton demjenigen der zur Untersuchung stehenden mit KCNS und HCl versetzten Flüssigkeit entspricht. Enthält die zu untersuchende Flüssigkeit Eisen in merklicher Menge, so muß sie verdünnt werden, bis die Intensität der Reaktion in die Vergleichsskala sich einreihen läßt. Das Ausmaß der Verdünnung muß sehr genau festgestellt werden.

Vergleichsreihe. In sehr verdünnten Eisenlösungen, nämlich von etwa 10^{-5} g Fe in 1 ccm, tritt bei Zufügen eines Überschusses von $(CNS)'''$ die rote Farbe des undissoziierten $Fe(CNS)_3$ nur bei saurer Reaktion auf, und zwar ist die Intensität der Farbe am größten bei einem Gehalt von ca. 2 n-HCl im Reaktionsgemisch; bei kleinerer und besonders bei größerer Konzentration von HCl ist die Farbe schwächer. Die Feststellung der optimalen H^+-Reaktion erfolgte mit Hilfe der Friedenthalschen Indicatorenmethode unter Benutzung der Standardlösungen von genau bekanntem H^+-Gehalt.[1]) In eine Reihe Reagensgläser wurde je 1 ccm Eisenlösung, 10^{-5} g Fe enthaltend, und 1 ccm konzentriertes KCNS hineingebracht; in jedes dieser Reagensgläser wurde 1 ccm HCl von solcher Stärke hinzugefügt, daß sich im Reaktionsgemisch 3 n- bzw. 2 n- bzw. 1 n- bzw. 0,1 bzw. 0,01 bzw. 0,001 bzw. 0,0001 n-HCl befand. Es zeigte sich, daß die intensivste Rötung, also die größte Konzentration an undissoziiertem $Fe(CNS)_3$, bei einer Konzentration von ca. 2 n-HCl im Gemisch auftritt.

Die definitiv benutzte Vergleichsreihe wurde auf folgende Weise zusammengestellt: Aus einer Lösung, die 10^{-4} g Fe''' in 1 ccm enthält, wurde in eine Reihe Reagensgläser 1 ccm bzw. 0,8 bzw. 0,6 bzw. 0,5 usw. ccm Lösung übertragen; dieselben Volumina wurden einer Lösung von 10^{-5} g Fe''' in 1 ccm entnommen und in weitere Reagensgläser übertragen.

[1]) Diese Stufen sind fertig zu haben bei den Ver. Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N., Scharnhorststraße 22.

Nachdem die betreffenden Reagensgläser mit destilliertem Wasser bis auf gleiches Volumen von 1 ccm Flüssigkeit gebracht waren, wurde zu jeder Lösung 1 ccm einer eisenfreien 6 n-Salzsäure und 1 ccm konzentrierte Rhodankaliumlösung hinzugefügt. Die Lösung wurde mit 1 ccm Äther ausgeschüttelt. Das Reaktionsgemisch entsprach einer 2 n-Salzsäure. Die ätherischen Schichten stellen nach der zunehmenden Intensität der Rotfärbung eine Farbentonleiter dar.

Beim Arbeiten mit anderen Säuren, wie HNO_3, H_2SO_4, H_3PO_4, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, traten Störungen zutage, die den Verlauf der gewünschten Reaktion hinderten. Außer mit Äther läßt sich das undissoziierte $Fe(CNS)_3$ auch mit Amylalkohol extrahieren, dabei ist die Intensität der Farbe in beiden Fällen die gleiche. Da Amylalkoholdämpfe gesundheitsschädlich sind, ist es bequemer, mit Äther zu extrahieren. Nach längerem Stehen (etwa nach 4 bis 6 Stunden) verschwindet die rote Farbe des undissoziierten $Fe(CNS)_3$, und es krystallisieren gelbe Nadeln aus. Durch teilweise Neutralisation wird die Dauerhaftigkeit der roten Farbe der ätherischen bzw. der amylalkoholischen Schicht bedeutend vergrößert; auch sei bemerkt, daß in der Kälte die Farbe sich länger haltbar erweist als bei Zimmertemperatur.

Die Verteilung des Eisenrhodanids auf Äther und Wasser zeigt eine derartig hohe relative Löslichkeit in Äther, daß sehr verdünnte Eisenlösungen bei einmaligem Durchschütteln mit Äther, stärkere Lösungen bei zwei- bis viermaligem Durchschütteln mit frischem Äther quantitativ von Eisen befreit werden können.

Merkwürdigerweise löst sich das Eisenrhodanid wohl in Äther und Amylalkohol, aber nicht merklich in einer ganzen Reihe von Fettlösungsmitteln, von denen Xylol, Toluol, Chloroform, Bromoform und Äthylbromid geprüft wurden. Die rote ätherische Lösung des Eisenrhodanids wird durch einen Überschuß von Chloroform sogar entfärbt.

Amylacetat und Aceton lösen dagegen Eisenrhodanid wie Äther und Amylalkohol.

Das spektroskopische Verhalten des Eisenrhodanids ist ein sehr charakteristisches. Die Absorption des Lichtes erfolgt bei steigender Konzentration von beiden Enden des Spektrums, bis bei genügender Sättigung eine leuchtend rote Linie sichtbar bleibt, während Ultrarot, Dunkelrot, Gelb, Grün, Blau und

Violett verschwunden sind. Nach diesem Verhalten erscheint das Eisenrhodanid für Lichtfilter sehr geeignet, die ein monochromatisches Rot liefern sollen. Durch die Ausschüttlung des Eisenrhodanids mit Äther läßt sich die quantitative Eisenbestimmung mit Rhodankalium und Salzsäure auch in ganz trüben, dunkelgefärbten Medien ohne Störung ausführen, wie in Harn, Tinte und dergleichen Flüssigkeiten. Eine smaragdgrüne Nickelsulfatlösung läßt sich durch Ausschütteln mit Äther von Eisensalzresten reinigen nach Zusatz von KCNS und HCl.

Ausführung der colorimetrischen Bestimmung des Eisens in der Kuhmilch.

5 ccm Kuhmilch wurden in einem tiefen Platintiegel auf trockenem Wege verascht; diese Prozedur nimmt bei sorgfältiger, genauer Arbeit, wobei jedes Verspritzen der Milch ausgeschlossen ist, nicht mehr als 10 bis 15 Minuten in Anspruch. Die Asche wurde mit 1 ccm der 6 n-HCl und 1 ccm Wasser aufgenommen, dann die Lösung mit 1 ccm der konzentrierten Lösung von KCNS versetzt und, wie oben, mit 1 ccm Äther ausgeschüttelt. (Im ganzen haben wir hier, wie in der Vergleichsreihe, je 4 ccm Flüssigkeit.) Zu dem Farbenton in der ätherischen Schicht wurde ein gleicher Farbenton in der Vergleichsreihe aufgefunden. Da die Konzentration des $Fe^{\cdots}$ in dem passenden Glied der Vergleichsreihe genau bekannt war, so ist damit auch die Konzentration des $Fe^{\cdots}$ der Kuhmilch leicht zu ermitteln. In dieser Weise fanden wir, daß in 1 l Kuhmilch 1,3 mg Eisen enthalten ist. — Bei sorgfältiger Veraschung von 500 ccm Kuhmilch — eine Prozedur, die mindestens 1 Tag Arbeit in Anspruch nimmt — wurde unter Berücksichtigung der Eisenmengen, die den Reagenzien von vornherein beigemischt waren, ein Wert von 1,4 mg Eisen im Liter gefunden. Dieser Wert ergab sich nämlich, nachdem die Lösung der Asche in HCl mit Na_2CO_3 teilweise neutralisiert und mit H_2SO_3 reduziert war. Nach längerem Kochen, bis die SO_2 vollständig entfernt war, wurde mit $^n/_{50}$-$KMnO_4$ titriert.[1])

[1]) Merkwürdigerweise kommen bei colorimetrischer Bestimmung des Eisens in Frauenmilch Störungen insofern zustande, als die rote Farbe des $Fe(CNS)_3$ fast augenblicklich in eine gelbrote Farbe übergeht. Die Natur des störenden Körpers konnte noch nicht festgestellt werden.

Wir haben uns ferner die Frage gestellt, in welcher Verbindung sich das Eisen in der Kuhmilch befindet und wie es verteilt ist. R. W. Raudnitz schreibt in seinem ausführlichen Referat über Milch (Ergebnisse der Physiologie 2, 1, 5, 269, 1903): „Das Eisen ist sicher größtenteils als Ion, d. h. in leicht nachweisbarer Form vorhanden; wenigstens erhält man nach Goppelröder auf der obersten Zone des in Milch tauchenden Filterpapiers die Eisenreaktion.... Nach Duclaux erscheinen von 0,005 g Fe_2O_3 bei Kuhmilch 0,002 g im Chamberland-Filtrate. Bunge aber meint, gestützt auf den Eisengehalt des von Lubawin dargestellten Nucleins und auf seine Versuche mit Eidotter, daß das Eisen in organischer Verbindung vorhanden sei. W. Oesterlein schließt aus der Tatsache, daß das Ätherextrakt der Milch ein nicht in Wasser, wohl aber in Salzsäure lösliches Eisensalz enthalte, daß das Eisen zum Teil als Eisenseife in der Milch vorhanden sei."

Folgende Versuche mit einer Friedenthalschen Zentrifuge geben einen Anhalt für die Verteilung des Eisens in der Milch:

Kuhmilch wurde etwa 12 Stunden lang zentrifugiert, mit einer Geschwindigkeit von ca. 8000 Touren pro Minute, der Durchmesser des Rades betrug 34 cm. Die Zentrifugalkraft beträgt in diesem Falle rund $1 \times 10^{+7}$ Dynen.

$$\frac{4\pi^2 \times r}{t^2} = \frac{4 \times 9 \times 17}{\left(\frac{1}{133}\right)^2}.$$

Während dieser Zeit teilte sich die Milch in drei Zonen; die oberste Zone bestand aus 2 Fettschichten, einer flüssigen und einer festen, dann folgte die Milchplasmaschicht und zu unterst das gesamte Casein mit einem Wassergehalt von etwa 40%, verunreinigt mit Lecithin und einigen noch näher zu bestimmenden Milchbestandteilen. Das Milchplasma war durchsichtig, aber opalescent, und zeigte mit den bekannten Eisenionreagenzien keine $Fe^{\cdots}$ auf; auch die Aschelösung des Milchplasmas hatte keine Eisenreaktionen gegeben. Dagegen fanden wir im Zentrifugat und in dem Fett annähernd gleiche Eisenmengen. Nach diesem Befunde ist also fettarme oder fettfreie Milch zugleich eine eisenarme Milch, namentlich die häufig bei der Säuglingsernährung verwandte Buttermilch.

Die colorimetrische Bestimmung des Eisens erlaubt die genaue Messung von Substanzmengen, die für die bisher üblichen chemischen Methoden unmeßbar und unwägbar waren. Bunsen meinte, daß durch die empfindliche Rhodanreaktion sich Eisen noch qualitativ nachweisen lasse in einer Flüssigkeit, die Eisen in einer Verdünnung von 1:500000 enthalte. Durch Ermittelung der optimalen Bedingungen (H^+-Ionengehalt, Rückdrängung der Dissoziation) ist es möglich geworden, Eisen nicht nur nachzuweisen, sondern genau quantitativ zu bestimmen in Lösungen, die Eisen nur im Verhältnis von 1:50 Millionen enthalten. Durch eine Indicatorenmethode lehrte der eine von uns eine Messung der H^+-Ionen in alkalischen Lösungen, die nur 1×10^{-14} H^+-Ion in Litern enthielten, das heißt also 1 Teil H^+ auf rund 100000 Billionen Lösungsmittel. Es ist nicht wahrscheinlich, daß so leicht eine zweite derartig empfindliche Meßmethode gefunden werden wird; nach dieser stellt die obige colorimetrische Bestimmung des Eisens augenblicklich die empfindlichste überhaupt bekannte chemische Meßmethode dar.

Es bedarf wohl nur eines kurzen Hinweises auf die Notwendigkeit ausgedehnter Kontrollen und Vorsichtsmaßregeln bei Anwendung einer so empfindlichen Meßmethode. Da Eisen in einem chemischen Laboratorium in Mengen, die von nun an zu berücksichtigen sind, nämlich Zehntausendstel Milligramme, sehr leicht als Verunreinigung sich einstellt, erhält man auch leicht allzu hohe Werte für Eisen. Die niedrigsten der erhaltenen Eisenwerte sind die wahrscheinlicheren, da die Fehler in der Regel eine Erhöhung herbeiführen. Korke und Gummistopfen sind ihres Eisengehaltes wegen überhaupt nicht mit den zu prüfenden Flüssigkeiten in Kontakt zu bringen. Fette und Mineralöle enthalten relativ beträchtliche Mengen Eisen. Von paraffinierten Gegenständen wird aber reinstem Leitfähigkeitswasser kein nachweisbarer Eisengehalt erteilt. Ausgedämpfte Gläser, nach Abegg behandelt, geben ebenfalls kein Eisen an die Reagenzien und Flüssigkeiten ab. Für die Beschaffung eisenfreien Rhodankaliums und eisenfreier Salzsäure muß Sorge getragen werden.

Durch Ausschüttelung des gebildeten Rhodaneisens mit mehrfach gewechseltem Äther lassen sich Reagenzien von den letzten Eisenspuren befreien. Es ist vorteilhaft, mit konzen-

trierten HCl-haltiger Rhodankaliumlösung alle benutzten Gläser vor dem Gebrauch noch einmal auszuspülen, da die geringste Verunreinigung mit Eisen sich alsdann durch Rotfärbung sichtbar machen läßt.

Es mag nicht ohne Interesse sein festzustellen, auf welchen Ursachen die Verschiedenheiten der Sichtbarkeit gefärbter Substanzen in Lösungen beruhen. Bildet ein Element mehrere gefärbte Ionen, so ist kein Grund einzusehen, warum die untere Grenze der Sichtbarkeit der Farbe — der Nullpunkt bei der colorimetrischen Meßmethode — nicht bei demselben Molgehalt erreicht werden sollte, es sei denn, daß die Absorption des Lichtes durch die einzelnen Ionen selber in sehr verschiedenem Grade vor sich geht. Bei der hohen Verdünnung, die durch die Grenze der Sichtbarkeit in hohen Schichten in geschwärzten Rohren bedingt ist, können wir alle benutzten dissoziierenden Substanzen als quantitativ dissoziiert annehmen. Ein Unterschied in der Empfindlichkeit der colorimetrischen Meßmethode wird daher durch den verschiedenen Dissoziationsgrad im allgemeinen nicht herbeigeführt werden. Es bleibt daher nur übrig, eine Verschiedenheit in dem Grade der Absorptionskraft den Ionen selber zuzuschreiben, die sich messen läßt durch Feststellung des Molgehaltes eben gefärbter Lösungen in Röhren von gleicher Länge. Eisenchloridlösung erlaubt in 10 cm hohem Rohre eben noch eine Unterscheidung von Wasser, wenn der Molgehalt im Liter 1×10^{-5} beträgt. Da Rhodaneisen bei sehr viel geringerem Molgehalt in 10 cm hoher Schicht sichtbar wird, muß die Absorption des Lichtes im Rhodaneisenmolekül eine vielmal größere sein als im Eisenion. Es steht zu hoffen, daß durch den weiteren Ausbau der colorimetrischen Nullpunktsmethoden im Sinne der oben angegebenen Eisenmethode eine ganze Anzahl von chemischen Reaktionen in ihrer Empfindlichkeit und Genauigkeit sich wird erheblich steigern lassen und die Messung einer physikalischen Konstante gefärbter Stoffe, nämlich die Stärke der Lichtabsorption im gefärbten Molekül oder Ion selber auf colorimetrischem Wege in verhältnismäßig einfacher Weise sich wird bewerkstelligen lassen.

Ein Beitrag zur Fettbestimmung im pathologischen Harne.

Von

Samuro Kakiuchi.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 17. März 1911.)

Mit 1 Figur im Text.

I. Einleitung nebst Prüfung des Fettgehaltes im normalen Harne.

In Japan kommen Fälle von chylurischen Kranken öfters vor. Es ist deshalb der Besitz einer Methode sehr erwünscht, die gestattet, das Fett im pathologischen Harne bequem und hinreichend genau zu bestimmen. Ehe man indes zur Ausarbeitung der Methode schreitet, muß zuerst die Frage entschieden werden, wie sich der Fettgehalt des normalen Harns verhält. Es wurde zuerst von K. A. H. v. Mörner[1]) darauf aufmerksam gemacht, daß der normale Menschenharn gewisse Mengen hochmolekularer Fettsäuren enthält. Dieselbe Angabe wurde bald darauf von S. Hybinette gemacht. Hybinette[2]) hat durch eine eigenartige Methode den Gehalt des normalen Harns an hochmolekularen Fettsäuren in 10 Litern zu 0,0165 bis 0,025 g bestimmt. Da eine derartige Untersuchung zurzeit in Japan noch nicht vorliegt, so habe ich auf Veranlassung von Prof. M. Kumagawa folgende Versuche ausgeführt.

Harne von 6 gesunden Laboranten wurden gesammelt. Nachdem dieselben auf Eiweiß- und Zuckergehalt mit negativem Resultate geprüft worden waren, wurden dieselben durch ab-

[1]) K. A. H. Mörner, Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharns. Skand. Arch. f. Physiol. 6, 332.

[2]) S. Hybinette, Über die Gegenwart von nicht flüchtigen fetten Säuren im normalen Menschenharne. Skand. Arch. f. Physiol. 7, 380.

solut fettfreies Papier[1]) abfiltriert. Je 10 Liter davon wurden nach dem Vorgange von Hybinette mit Bariumhydrat gefällt und der Niederschlag auf dem Wasserbade getrocknet. Alsdann wurde der fein gepulverte Niederschlag mit je 1 Liter Alkohol (96%), der mit 1 Volumprozent konzentrierter Schwefelsäure versetzt war, $^1/_2$ Stunde lang ausgekocht und nach dem Erkalten abfiltriert. Das Filtrat wurde nun mit Natronlauge neutralisiert, abfiltriert und auf dem Wasserbade verdunstet. Der Rückstand hiervon wurde in Wasser gelöst, durch Salzsäure stark angesäuert und mit Äther geschüttelt. Das Ätherextrakt, das nach dem Abdampfen des Äthers 2 Stunden lang bei 50° C getrocknet wurde, wurde abweichend von Hybinette nochmals mit Petroläther gereinigt. Hierzu wurde der Ätherextrakt in reinem Petroläther aufgelöst, durch Asbest abfiltriert, das Filtrat verdunstet und bei 50° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die so dargestellten Petrolätherextrakte wogen für je 10 l normalen Harns wie folgt:

Probe	Petroläther-extrakt g	Spez. Gewicht des Harns
1.	0,0248	1,022
2.	0,0215	1,021
3.	0,0244	1,022
4.	0,0238	1,020
Mittel	0,0236	

Da S. Hybinette an einem größeren Material die Natur des Extraktes hinreichend genau feststellen konnte, kann kein Zweifel mehr obwalten, daß das Extrakt aus hochmolekularen Fettsäuren besteht. Obwohl ich wegen Mangel an Material nicht imstande war, den Petrolätherextrakt durch Elementaranalyse als reine Fettsäure zu charakterisieren, so konnte ich ebenfalls aus der gelatinierenden Eigenschaft des mit Soda aufgelösten Extraktes beim Erkalten, aus der Schaumbildung der verdünnten Lösung beim Schütteln, aus der Fällung der neutralen Lösung mit Chlorbarium- oder Magnesiumsulfatlösung,

[1]) Das Filterpapier wurde durch Kochen mit schwacher Natronlauge, nachherige Behandlung mit Salzsäure und durch darauffolgendes Auswaschen mit heißem Wasser vollständig entfettet. Auch alle hierzu angewandten Reagenzien waren vorher mit negativem Resultat auf hochmolekulare Fettsäuren geprüft.

aus der Leichtlöslichkeit des mit Säure gefällten Niederschlages in Äther resp. Petroläther usw. mit Sicherheit schließen, daß das vorliegende Petrolätherextrakt aus hochmolekularen Fettsäuren besteht.

Demnach enthält der normale Menschenharn in Übereinstimmung mit S. Hybinette im Mittel 0,024 g hochmolekularer Fettsäuren pro 10 l.

Wenn somit das Vorhandensein von ein paar Zehntelmilligramm hochmolekularer Fettsäuren in 100 ccm normalen Menschenharns nunmehr sicher steht, so kann diese geringfügige Menge der Fettsäuren für die Fettbestimmung im pathologischen Harne ohne merklichen Fehler gänzlich vernachlässigt werden.

Nach dieser Voruntersuchung gehe ich im folgenden zur eigentlichen Fettbestimmungsmethode im pathologischen Harne über.

II. Vorversuche mit einem neuen Vakuumapparate.

Die neue Fettbestimmungsmethode durch Verseifung nach Kumagawa-Suto ist inzwischen im hiesigen Laboratorium durch Y. Shimidzu und R. Watanabe an fast allen tierischen Bestandteilen mit gutem Erfolg angewendet worden. Als indes K. Suto etwa je 50 ccm normalen Menschenharns verseifte, resultierte stets eine gewisse Menge (ca. 0,02 g pro 100 ccm Harn) von Petrolätherextrakt, das natürlich keine Fettsäure ist. Durch die Untersuchungen von K. Yamada sowie von mir hat es sich bald herausgestellt, daß der Petrolätherextrakt des normalen Harns nach der Verseifung hauptsächlich die aus Hippursäure abgespaltene Benzoesäure enthält, die mit etwas Phenolen und aromatischen Oxysäuren vermengt ist. Da dieselben sämtlich flüchtige Substanzen sind, so kam ich auf den Gedanken, dieselben durch Vakuumdestillation von den hochmolekularen Fettsäuren quantitativ zu trennen. Zu diesem Zwecke habe ich mir einen einfachen Vakuumverdampfungsapparat ersonnen, dessen Konstruktion aus der Figur 1 (S. 140) leicht ersichtlich ist. Der Apparat besteht aus 2 Halbkugeln. Die untere Halbkugel hat einen maximalen Durchmesser von ca. 9 cm, eine Höhe von ebenfalls ca. 9 cm und besteht aus dickem Glas oder Kupfer. Der obere plangeschliffene Saum hat eine Breite von 1,5 cm. Die ebenso weite obere

Halbkugel besteht aus dickem Glas, hat eine Höhe von 7 cm und einen geschliffenen Saum von 1 cm Weite. Die Kuppe verlängert sich in ein 1,5 cm weites umgebogenes Rohr, das durch Gummipfropf mit einem engeren Glasrohr in Verbindung steht. Dieses besitzt einen Dreiweghahn, der je nach der Stellung den Innenraum des Apparates entweder mit dem Außenraum oder mit der Wasserstrahlpumpe in Verbindung bringt.

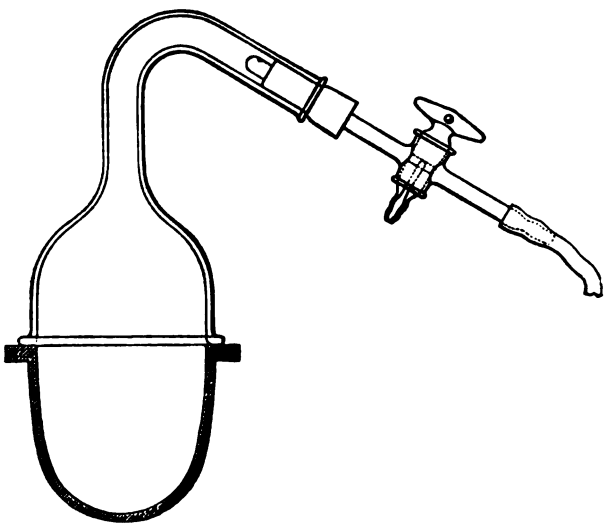


Fig. 1.
Vakuumabdampfungsapparat. 1/4 natürl. Größe.

Bei dem Versuche wird in den Apparat eine etwa 80 bis 100 ccm fassende Platinschale oder ein Porzellantiegel von etwa demselben Rauminhalt mit Substanz hineingelegt. Der ganze Apparat wird derart auf das kochende Wasserbad aufgelegt, daß die untere Halbkugel mit ihrem oberen Rande auf dem Kupferringe des Bades ruht, und mittels der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Wenn die anliegenden Ränder der beiden Halbkugeln gut geschliffen sind, so kann der innere Druck mit Leichtigkeit bis auf 30 bis 40 mm Hg herabgesetzt werden.

Mit diesem Apparate habe ich folgende Vorversuche angestellt:

1. Stearinsäure puriss. von Merck wurde einmal aus Alkohol umkrystallisiert.

Hiervon

a) genommen . . . . . 0,0653 g
$5^1/_2$ Stunden evakuiert . . 0,0651 g
b) genommen . . . . . 0,0582 g
5 Stunden evakuiert . . . 0,0582 g

Wie erwartet, bleibt das Gewicht der Stearinsäure nach 5stündiger Evakuation unverändert.

2. Ölsäure puriss. frei von Linolsäure (E. Merck) wurde in Äther gelöst, mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand 12 Stunden lang bei 50° C im trocknen Kohlendioxydstrom getrocknet.

Hiervon	g	Gewichtsverlust g	Gewichtsverlust %
genommen	0,3882		
evakuiert; n. 3 St. wog die Substanzmenge	0,3798	0,0084	2,16
„ „ 6 „ „ „ „	0,3782	0,0016	0,42
„ „ 9 „ „ „ „	0,3769	0,0013	0,34
„ „ 12 „ „ „ „	0,3760	0,0009	0,24
„ „ 15 „ „ „ „	0,3753	0,0007	0,19
„ „ 18 „ „ „ „	0,3746	0,0007	0,19

In den ersten 3 Stunden war die Gewichtsabnahme sehr beträchtlich. In der folgenden Zeit war dieselbe jedoch nur klein. Doch wurde das Gewicht selbst nach 18stündiger Evakuation nicht konstant. Die anfängliche Abnahme rührt wohl sicher von einem Reste an Lösungsmittel her. Es läßt sich indes nicht entscheiden, ob diese Gewichtsabnahme in der späteren Zeit ebenfalls von dem Reste des Lösungsmittels herrührt, oder vielmehr auf die Verflüchtigung der Ölsäure selbst deutet. Immerhin ist der Gewichtsverlust sehr klein, und man kann wohl annehmen, daß hochmolekulare Fettsäuren bei unserer Vakuumerhitzung sich nicht merklich verflüchtigen, um so mehr, da die Siedepunkte von Stearinsäure und Ölsäure bei 15 mm Hg über 230° C liegen.

3. Im folgenden habe ich geprüft, ob Benzoesäure und andere aus normalen Harnbestandteilen stammende, im Petroläther lösliche Substanzen durch unsere Vakuumerhitzung vollständig vertrieben werden können. Für unseren Zweck kommen hier nur Benzoesäure, aromatische Oxysäuren und Phenole in Betracht. Da indes die letzteren bekanntermaßen sehr

leicht flüchtig sind, so habe ich von ihrer Prüfung Abstand genommen und nur die beiden ersteren in den Kreis derUntersuchungen gezogen.

A. Aromatische Oxysäuren, die vor Jahren aus Menschenharn dargestellt und im hiesigen Laboratorium geschlossen aufbewahrt worden sind:

Angewandt	0,022 g
Nach 3 Stunden Evakuation . . .	0,0005 g

Es blieb eine ganz spärliche, braun gefärbte Masse zurück, die wohl von Verunreinigungen herrührte.

B. Reine Benzoesäure wurde mehrmals aus heißem Alkohol umkrystallisiert.

Hiervon

angewandt	0,0600 g
Ölsäure extra zugesetzt	0,0651 g
Summa	0,1251 g
Nach 3 Stunden Evakuation . . .	0,0683 g
„ 5 „ „ . . .	0,0653 g

Da eine so große Menge Benzoesäure für eine Probe der Fettbestimmung im Harne tatsächlich nicht vorkommt, so kann man mit Sicherheit annehmen, daß die im Petrolätherextrakt des Harns nach der Verseifung beigemischte Benzoesäure durch 3stündige Vakuumerhitzung vollständig vertrieben werden kann.

Nachdem alle fraglichen Punkte durch Kontrollversuche zugunsten unserer Voraussetzung entschieden worden sind, schicke ich hier den Gang der Fettbestimmung im Harne in definitiver Form voraus.

III. Ausführung der neuen Methode und ihre Brauchbarkeit.

50 ccm Harn werden in ein ca. 200 ccm fassendes Becherglas gebracht und mit 14 ccm[1]) gesättigter Natronlauge (1,5 D) versetzt und auf kochendem Wasserbad mit einer Glasglocke bedeckt 2 Stunden erhitzt. Die weitere Verarbeitung geschieht genau nach der Vorschrift von Kumagawa-Suto. So wird der Inhalt nach dem Erkalten in einen 500 ccm fassenden Scheidetrichter hineingebracht, 30 ccm konzentrierter Salzsäure vorsichtig hinzu-

[1]) Wegen des Harnstoffgehaltes wurde die Lauge auf etwa die doppelte Menge vermehrt wie sonst.

gefügt und gekühlt. Nachdem der Inhalt Zimmertemperatur angenommen hat, wird derselbe mit 70 ccm Äther versetzt, geschüttelt, die Wasserschicht abgezogen und die ätherische Schicht in ein Becherglas abgegossen. Der Scheidetrichter wird mit ein wenig Äther ausgespült und der Waschäther zur Hauptmasse zugefügt. Die wässerige Lösung wird noch einmal mit etwa 50 ccm Äther geschüttelt, derselbe mit dem vorigen vereinigt. Die ganzen Ätherauszüge werden schließlich abgedampft. Alsdann wird der Rückstand 2 Stunden lang bei 50° C getrocknet und noch warm mit Petroläther übergossen. Nach etwa 1 Stunde wird der Petrolätherauszug durch Asbest in eine 80 bis 100 ccm fassende Platinschale oder in einen Porzellantiegel von etwa demselben Rauminhalt abfiltriert und abgedampft. Die Platinschale oder der Porzellantiegel wird nun in den Vakuumapparat hineingebracht und im kochenden Wasserbade 3 Stunden lang bei 30 bis 40 mm Hg gelassen. Danach wird die Schale oder der Tiegel im Vakuumexsiccator mit Chlorcalcium gebracht und nach dem Erkalten gewogen.

Kontrolle.

Als 50 ccm normalen Harns genau nach dem beschriebenen Gang verarbeitet wurden, blieben nur 0,0003 g Substanz zurück, eine Menge, die für unseren Zweck ganz vernachlässigt werden darf.

Hauptversuche.

Je 50 ccm chylurischen Harns, genau ebenso verarbeitet, ergaben folgende Resultate:

1.	0,2105 g	= 0,421 g/dl[1])
2.	0,2131 g	= 0,426 g/dl
3.	0,2111 g	= 0,422 g/dl
Mittel	0,2115 g	= 0,423 g/dl

Diese Petrolätherextrakte zeigten alle charakteristischen Eigenschaften hochmolekularer Fettsäuren.

Vergleich der neuen Methode mit der Alkoholmethode.

Da der chylurische Harn mehr oder weniger Eiweiß enthält, so kam im hiesigen Laboratorium seit Jahren eine Methode der Fettbestimmung bei demselben in Gebrauch, die darin be-

[1]) g/dl = g im Deziliter, d. h. „Gramm pro 100 ccm".

steht, daß der neu erzeugte Eiweißniederschlag, der quantitativ das Fett mit einschließt, mit Alkohol ausgezogen wird. Ich habe nun von demselben chylurischen Harne, dessen Fettgehalt, wie oben angegeben, zu 0,423 g/dl festgestellt wurde, 50 ccm genau abgemessen und mit dem gleichem Volum Wasser verdünnt. Hierzu wurden 35 ccm gesättigter Kochsalzlösung und 4 bis 5 Tropfen Essigsäure (36%) gesetzt und die Mischung auf dem kochenden Wasserbade mit einer Glasglocke bedeckt erwärmt. Der hierdurch vollständig ausgefällte Eiweißniederschlag wurde durch fettfreies Papier abfiltriert und einmal mit Wasser ausgewaschen. Alsdann wurde der Niederschlag mitsamt Filterpapier im Kumagawa-Sutoschen Heißextraktor mit absolutem Alkohol erschöpft. Das alkoholische Filtrat wurde mit Kalilauge verseift, der Alkohol verjagt und weiter genau nach der Vorschrift von Kumagawa-Suto verarbeitet.

Die gewonnenen Petrolätherextrakte aus je 50 ccm chylurischen Harns betrugen:

1.	0,2028 g
2.	0,2082 g
Mittel	0,2055 g = 0,411 g/dl

Die beiden Proben stimmten nicht gut überein. Diese Schwankung rührt vermutlich von der umständlichen Manipulation her. Wir haben nach der neuen Methode, wie erwähnt, im Mittel dreier sehr gut übereinstimmender Proben erhalten:

0,423 g/dl.

Daß die Ausbeute nach der Alkoholmethode etwas geringer ist, beruht wohl zum Teil darauf, daß der mit Alkohol extrahierte Niederschlag noch etwas Fett zurückgehalten hat.

Hiernach glaube ich, daß die neue Methode der Fettbestimmung im pathologischen Harne mittels des von mir ersonnenen Vakuumabdampfungsapparates viel genauer und schneller zum Ziele führt.

Über Entgiftung glucosidischer Herzgifte durch Cholesterin in Versuchen am ausgeschnittenen Froschherzen.

Von

Theodor Karaúlow aus Kasan.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 18. März 1911.)

Mit 3 Figuren im Text.

Die bekannte Entdeckung Ransoms, daß Saponin durch Cholesterin hinsichtlich seiner hämolytischen Wirkung entgiftet werden kann, hat eine zur Verallgemeinerung herausfordernde Theorie bekommen durch die bemerkenswerte Feststellung Windaus[1]), daß mindestens ein Glucosidcholesterid — das des Digitonins — als chemischer Körper darstellbar ist.

Alle Glucoside von Saponincharakter haben mit den echten, therapeutisch bewährten Digitalisglucosiden die physiologische Wirkungseigentümlichkeit gemeinsam, den Ventrikel des ausgeschnittenen Froschherzens unter der Begleiterscheinung des sog. systolischen Stillstandes zu töten.

Die Windaussche Digitonin-Cholesterin-Reaktion liefert ein festes, in Wasser unlösliches Reaktionsprodukt, das meines Wissens kein Analogon unter den anderen möglichen Glucosid-Cholesteriden hat. Wenn nun auch andere Cholesteride als feste Phase nicht aus dem Reaktionsgemisch ausfallen, so ist damit ihre Existenz nicht ausgeschlossen, vielmehr denkbar, daß die an sich vielleicht reversible Reaktion mit anderen Glucosiden zu einem Anteil an Cholesterid in löslicher Phase im ganzen Reaktionsgemisch führt. Wenn das in beträchtlichem Maße der Fall ist, so muß durch Zugabe von Cholesterin die

[1]) Windaus, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 238.

Konzentration des ungebundenen Glucosids in einem quantitativ bekannten Reaktionsgemisch vermindert, damit der Giftwert einer wirksamen Glucosidlösung abgeschwächt, bei Überschuß von Cholesterin eventuell ganz aufgehoben werden.

Ich habe, ohne auf das Prinzipiell-chemische der Frage mich einzulassen, auf Veranlassung von Prof. Straub den pharmakologischen Teil, die Entgiftung von digitalisartig wirkenden Glucosiden, untersucht. Bei der Empfindlichkeit der systolischen Wirkung am Ventrikel war a priori ein eindeutiges Resultat im positiven wie negativen Sinne zu erwarten.

Die verwandten Glucoside waren neben den zugänglichen echten Digitalisglucosiden auch jene Pseudo-Digitaliskörper im pharmakologischen Sinne, wie Saponin, Digitonin, Helleborein, die nur mit dem Ventrikelmuskel bei unmittelbarem Kontakt das Digitalissymptom des systolischen Stillstandes zeigen, die aber therapeutisch wegen fehlender oder zu langsamer Resorption gar nicht oder nur wenig brauchbar sind.

Die verwandte Methode war nach ihrer physiologischen Seite hin diejenige, die inzwischen[1]) von Straub[2]) publiziert worden ist. Volum der Giftlösung immer 2 ccm.

Die Lösungen resp. die zu untersuchenden Reaktionsgemische wurden immer unmittelbar vor dem Versuch hergestellt. Meist verfuhr ich so, daß 10 ccm der mit Ringerscher Flüssigkeit hergestellten Glucosidlösung bekannten Gehaltes und bekannter Wirksamkeit im Porzellanmörser mit einem großen Überschuß von Cholesterin (0,5 bis 1,0 g) durch sehr intensives Reiben zu einer dünnen, sehr langsam filtrierenden Emulsion angerührt wurde. Das Filtrat war immer etwas trübe und opalisierend.

Daneben stellte ich aber auch Versuche mit Lösungen an, in denen Glucosid und Cholesterin intensivere Bindungsmöglichkeit hatten. Die wässerige Glucosidlösung wurde mit dem gleichen Volum einer ätherischen Cholesterinlösung heftig geschüttelt und der Äther mit der Wasserluftpumpe abgeblasen. Das Cholesterin fiel dann natürlich wieder aus, sehr fein ver-

[1]) Die Arbeit des Herrn Karaúlow ist seit Juli 1910 abgeschlossen, sie erscheint durch meine Schuld erst jetzt, da ich zur sprachlichen Redigierung bisher keine Zeit fand. Straub.

[2]) W. Straub, diese Zeitschr. 28, 392, 1910.

teilt im Gemisch Saponin-Cholesterin, grobflockig und an den Wänden des Gefäßes klebend bei Antiarin und Strophanthin.

Endlich wurden auch Versuchsreihen angestellt mit folgender Darstellungsart der Giftlösung. Die alkoholische Giftlösung bekannten Gehaltes wurde mit einer gleichfalls alkoholischen 1%igen Cholesterinlösung vermischt. Auf dem Wasserbad wurde der Alkohol vollständig entfernt, der Rückstand mit der vorgesehenen (20 ccm) Menge Ringer-Lösung versetzt, erwärmt und filtriert.[1])

Das Cholesterin war Merckscher Präparat, es wurde vor Verwendung zweimal aus Alkohol umkrystallisiert.

Saponin.

(Quillajasaponin Mercks.)

Dosen und Wirkungsintensitäten:

Unterste Grenze: 0,01 mg ist wirkungslos.

0,02 mg schwache Wirkung, die im Laufe einer Stunde zurückgeht.

0,4 mg kontinuierliche Abschwächung der Hubhöhen unter langsamer (ca. 60 Minuten) Entwicklung eines systolischen Stillstandes.

0,5 mg systolischer Stillstand nach einigen Minuten. Vergiftung kann durch Auswaschen rückgängig gemacht werden (reversibel!).

2,0 mg übermaximale Dosis. Systolischer Stillstand nach wenigen Sekunden; durch noch so intensives Waschen ist das Herz nicht mehr zu beleben.

Die tödliche Menge von 2 mg kann durch Behandeln mit Cholesterin im Überschuß völlig entgiftet werden (siehe Fig. 1). Es verhält sich also das Saponin bei der Herzwirkung unter Cholesterineinfluß nicht anders als bei der Hämolyse. Es ist gleichgültig, nach welcher der drei oben geschilderten Methoden die chemische Entgiftung bewerkstelligt wurde.

Bei weniger intensiver Behandlung läßt sich die Saponinlösung auch partiell entgiften, so daß das zu prüfende Herz nur länger dauernde reversible Abschwächung der Systolenhöhen zeigt.

Die Saponinlösungen haben nach der Cholesterinbehandlung ihr Schaumbildungsvermögen verloren.

---

[1]) In der tabellarischen Zusammenstellung der Resultate werden diese Methoden kurz: Verreibung, Äther, Alkohol bezeichnet.

Digitonin.

(Präparat von Merck, von Prof. Windaus freundlichst überlassen.)

Die Wirkung am Froschventrikel ist prinzipiell und fast quantitativ dieselbe wie beim Saponin.

0,5 mg bewirkt die von selbst vorübergehende Vergiftung.

0,7 mg systolischer Stillstand nach einer Minute, der auch nach längerem Bestehen durch Auswaschen wieder behoben werden kann, das Herz pulsiert dann normal weiter.

2,0 mg irreversibler systolischer Stillstand.

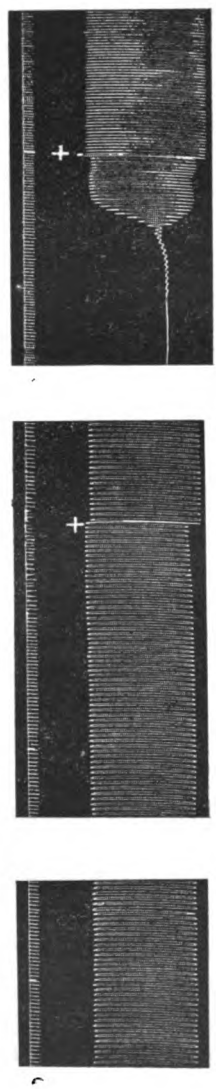


Fig. 1.

A Saponin 1:1000 ohne Cholesterin, *B* — mit $\frac{1}{10}$ Cholesterin. *I* Im Anfang der Vergiftung, *II* 20 Minuten nach der Vergiftung. + Zugabe des Saponins.

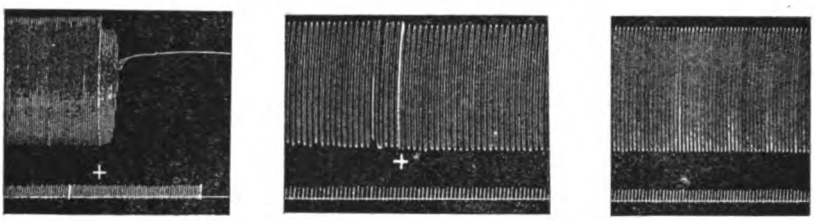
Digitonin kann also in wässeriger Lösung durch Cholesterinbehandlung völlig entgiftet werden (Fig. 2). Die Windaussche Reaktion verläuft also auch in wässeriger Lösung und mit einer Intensität, die zur Bindung der kleinen physiologisch wirksamen Mengen genügt.

Ich hatte auch reines, von Prof. Windaus dargestelltes Digitoncholesterid, das in Wasser völlig unlöslich ist, zur Verfügung. Durch intensives Verreiben mit Ringer-Lösung stellte ich davon eine 1%ige Emulsion her. Sie war am Herzen völlig wirkungslos.

Das Digitonin kommt bekanntlich[1]) nur in den Digitalissamen, nicht aber in den Blättern vor, kann also aus äußeren Gründen schon keine therapeutische Bedeutung haben. Es ist aber auch aus pharmakologischen Gründen ebenso wenig wie das Quillajasaponin ein Herzmedikament, denn

[1]) Kiliani, Arch. d. Pharmazie 243, 1905.

seine Herzwirkung ist nicht spezifisch im Sinne der Verteilung. Injiziert man kleinen Fröschen in zwei Lymphsäcken je ein Milligramm der Substanz, eine Menge, die für den ausgeschnittenen Ventrikel übermaximal ist, so tritt — wie übrigens bekannt — auch im Laufe von Tagen nicht die Spur einer Herzwirkung ein; das Gift ist also nicht resorbierbar.



A *B* *I* *II*

Fig 2.

A Digitonin 1:2000 ohne Cholesterin, *B* mit Cholesterin.
I Im Anfang der Vergiftung, *II* 20 Minuten nach der Vergiftung.
\+ Zugabe des Digitonins.

Helleborein.

0,2 mg Helleborein bewirken unter ständiger rhythmischer Tätigkeit im Laufe von ca. 1 Stunde einen diastolischen Stillstand.

0,5 mg ebenso, nur ist die rhythmische Tätigkeit oft von längerdauernden Stillständen des Ventrikels — nicht des Vorhofs — unterbrochen.

1,0 mg systolischer Stillstand in 20 bis 30 Minuten.

2,0 mg systolischer Stillstand nach 10 Minuten.

Die Wirksamkeit des Helleboreins wird durch Cholesterin nicht in dem Maße aufgehoben, wie dies bei den bisher untersuchten Glucosiden der Fall war. Eine teilweise Entgiftung findet indessen doch statt, die Helleboreinlösung verliert ihren physiologischen Titerwert. Dies äußerte sich in meinen Versuchen darin, daß einmal der endliche Stillstand mit dem Helleborein-Cholesteringemisch durchschnittlich in der doppelten Zeit erreicht wird, und andererseits darin, daß der erreichte Stillstand dann ein diastolischer resp. nicht rein-systolischer ist, wie nach der Dosis von 2,0 mg zu erwarten war. Die Tabelle I und die Figur 3 sollen dies belegen.

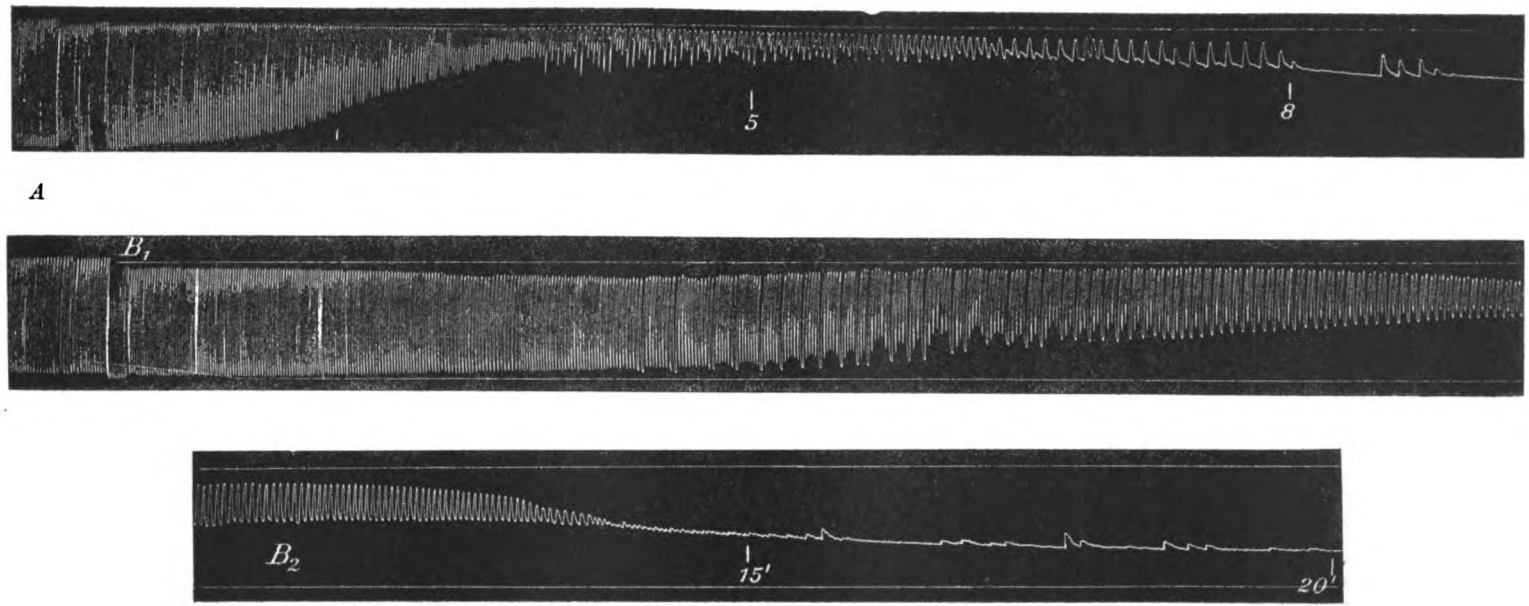


Fig. 3.

A Wirkung von Helleborein 1:1000, starke systolische Wirkung mit rascher Entwicklung.
B Mit Cholesterin behandeltes Helleborein gleicher Konzentration. Langsame Entwicklung eines fast diastolischen Stillstandes.
B 2 ist die unmittelbare Fortsetzung von *B 1*.

Tabelle I.
Helleborein.

Versuchs-Nr.	Helleborein mit oder ohne Cholesterin	Konzentration der Helleboreinlösung	Menge des Cholesterins %	Methode der Cholesterinbehandlg.	Art des Stillstandes	Zeit bis zum Stillstand Min.
35	ohne	1:1000		Äther	Systol.	11
34	mit		1		Diastol.	24
37	ohne	1:1000		Verreiben	Systol.	11
36	mit		10		Diastol.	20
38	ohne	1:1000		Alkohol	Systol.	12
39	mit		1		Mittel	30
41	ohne	1:1000		Alkohol	Systol.	14
40	mit		1		Diastol.	25
59	ohne	1:1000		Verreiben	Systol.	8
60	mit		10		Mittel	14
61	ohne	1:2000		Alkohol	Systol.	22
63	mit		2		Diastol.	77

Das Helleborein ist bekanntlich ein schlechtes Digitalisglucosid im therapeutischen Sinne, es ist unsicher resorbierbar, nur in vergleichsweise hohen Dosen selbst am ausgeschnittenen Herzen wirksam, schäumt in wässeriger Lösung und steht — wie jetzt gezeigt wurde — auch hinsichtlich des Vermögens, Cholesterid zu bilden, den echten Saponinglucosiden nahe.

Echte Digitalisglucoside.

Strophanthin.

Die nun folgenden Glucoside unterscheiden sich von den vorhergehenden pharmakologisch schon darin, daß sie weit giftiger sind, die Wirkung ist durch Waschen schwer oder gar nicht zu beheben, je nach der Konzentration bleibt der Ventrikel systolisch oder diastolisch stehen.

Von Strophantin Boehringer wirkten unter den Bedingungen meiner Versuche als Minimum 0,003 mg im Laufe von 1 bis 2 Stunden diastolisch stillstellend.

0,02 mg machen in etwa 15 Minuten Stillstand in Mittelstellung zwischen Systole und Diastole, während

0,2 mg die maximale systolische Contractur im Laufe von wenigen Minuten bewirken. (Man beachte die kleinen Dosen im Vergleiche zu Saponinglucosiden.)

Eine Cholesteridbildung konnte nun bei Strophanthin nach Ausweis der Tabelle II unter keiner Bedingung des Experimentes festgestellt werden.

Tabelle II.
Strophanthin.

Versuchs-Nr.	Strophanthin mit oder ohne Cholesterin	Konzentration der Lösung	Menge des Cholesterins %	Methode der Cholesterinbehandlg.	Art des Stillstandes	Zeit bis zum Stillstand Min.
42	ohne	1:1000			Systol.	5
43	mit		10	Verreibung	„	6
44	ohne	1:10000			„	12
45	mit		2	Alkohol	„	10
47	ohne	1:100000			„	18
51	mit		10	Verreibung	„	20

Die Bedingungen zu einer Verankerung des Glucosids sind gewiß hier optimale, denn es stand ja einer minimalen Menge von Strophanthin ein erdrückender Überschuß von Cholesterin gegenüber.

Antiarin.

Antiarin von Boehringer verhält sich nach Ausweis der Tabelle III genau wie Strophanthin.

Tabelle III.
Antiarin.

Versuchs-Nr.	Antiarin mit oder ohne Cholesterin	Konzentration d. Antiarinlösung	Menge des Cholesterins %	Methode d. Cholesterinbehandlung	Art des Stillstandes	Zeit bis zum Stillstande Min.
55	ohne	1:1000	2		Systolisch	5
56	mit			Alkohol	„	4
28	ohne	1:5000			„	$4^1/_2$
29	mit		10	Verreibung	„	5
52	ohne				„	8
54	mit	1:5000	10	„	„	32
84	ohne	1:10000			„	14
85	mit		10	„	„	8

Glucoside der Blätter von Digitalis purpurea.

Es kommen 2 Glucoside in Betracht, das Digitoxin und das Digitalein Kilianis. Das rein dargestellte Digitoxin ist in Wasser und Ringerscher Lösung nicht löslich, es scheidet also aus diesem äußeren Grunde aus.

Vom Digitalein hatte ich durch freundliche Vermittlung Prof. Kilianis ein aus Samen und ein aus Blättern isoliertes

Glucosid zur Verfügung. Am ausgeschnittenen Herzen verhielten sich beide Sorten des Glucosides gleich. Es ist ein leicht resorbierbares Glucosid, von dem 0,4 mg den systolischen Stillstand in ca. 15 Minuten, 0,2 mg Stillstand in Mittelstellung in 60 Minuten verursacht.

Eine Entgiftung durch Behandlung mit Cholesterin findet (siehe Tabelle IV) nicht statt.

Tabelle IV.

Digitalein.

Versuchs-Nr.	Digitalein mit oder ohne Cholesterin	Konzentration der Lösung	Menge des Cholesterins %	Methode d. Cholesterinbehandlung	Art des Stillstandes	Zeit bis zum Stillstande Min.
63	ohne	1:1000		Verreibung	Systolisch	$3^1/_2$
64	mit		10		„	$3^1/_2$
65	ohne	1:5000			„	$16^1/_2$
66	mit		10	„	„	19
67	ohne	1:5000			„	$18^1/_2$
68	mit		1	Alkohol	„	16

Digitalisinfus.

Endlich wurde noch der Infus der Folia Digitalis auf Wertbeeinflussung durch Cholesterin untersucht.

Aus Folia Digitalis titrata von Caesar und Loretz mit einem Valor 4,0 des nach Focke 10%igen Infuses wurde mit Hilfe Ringerscher Lösung ein 4%iges Infus hergestellt. Die Infundierung wurde stets genau 15 Minuten lang unterhalten, der Kolatur wurde das vom Ausgangsvolum fehlende Flüssigkeitsquantum durch Ringer-Lösung wieder ersetzt. Das Infus reagiert bekanntlich durch Pflanzensäuren deutlich sauer und kann deshalb nur nach Neutralisation mit Soda in das Herz gebracht werden. Die Ausgangslösung wurde in verschiedenen Verdünnungsgraden verwendet.

4% iges Infus: Stillstand systolisch in wenigen Sekunden,
2 „ „ „ „ „ 1 Min.,
1 „ „ „ mittel in 6 bis 10 Min.,
0,5 „ „ „ diastolisch in 40 Min.,
0,25 „ „ „ „ „ 70 Min.

Bei Behandlung mit Cholesterin in großem Überschuß verlor keine der Infusverdünnungen ihren Wirkungswert in merkbarer Weise (Tabelle V).

Tabelle V.
Digitalisinfus.

Versuchs-Nr.	Inf. digital. mit oder ohne Cholesterin	Konzentration des Infusums %	Menge des Cholesterins %	Methode d. Cholesterinbehandlung	Art des Stillstandes	Zeit bis zum Stillstande Min.
91	ohne	0,5			Diastol.	45
92	mit		10	Verreibung	„	40
89	ohne	1			„	6
90	mit		10	Verreibung	„	7

Es sind also in den Folia Digitalis nur solche Digitalisglucoside enthalten, die keine Verbindung mit Cholesterin eingehen, also Glucoside vom Typus Strophanthin, d. h. echte therapeutisch brauchbare Digitaliskörper, und es fehlen cholesteridbildende Körper vom Saponintypus, also speziell das Digitonin. Diese Feststellung scheint mir mehr als eine Bestätigung der Meinung Kilianis[1]) vom Fehlen des Digitonins in den Blättern, denn meine Versuche lehren, daß nicht einmal jene geringen Mengen Digitonins in den Blättern enthalten sind, die zu einer physiologischen Wirkung genügen, bei der chemischen Aufarbeitung der Droge aber verloren gehen.

Zusammenfassung.

Die Untersuchung brachte also das Ergebnis, daß echte therapeutisch bewährte Digitalisglucoside durch Cholesterin nicht entgiftet werden, dies geschieht quantitativ nur bei den echten Saponinen, zu denen auch das Digitonin der Digitalissamen gehört, das therapeutisch geringwertige Helleborein steht in der Mitte zwischen beiden Typen, eine Bestätigung der Anschauung Koberts[2]): „Die Brücke von den Saponinsubstanzen zu denen der Digitaleingruppe bildet das Helleborein."

[1]) Kiliani, Über Digitonin. Arch. d. Pharmazie 243, 1905.

[2]) Kobert, Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904.

Die Erhöhung der Giftwirkung von KCl durch niedrige Konzentrationen von NaCl.

Von

Jacques Loeb.

(Unter Mitwirkung von Hardolph Wasteneys.)

(Aus dem Rockefeller Institute, New York.)

(Eingegangen am 28. Februar 1911.)

In der voraufgehenden Arbeit habe ich für Fundulus gezeigt, daß KCl-Lösungen, die bis zu 6,6 ccm $^{m}/_{2}$ KCl in 100 ccm der Lösung enthalten, durch NaCl entgiftet werden, wenn die Lösung 15 bis 18 Moleküle NaCl auf 1 Molekül KCl enthält. Zugleich erwähnte ich, daß, wenn man zu wenig NaCl zusetzt, dieser Zusatz die Giftigkeit der KCl-Lösung erhöht. Da diese sensitivierende Wirkung kleiner Mengen von Natriumsalzen für die Giftwirkung von Kaliumsalzen neu ist und da deren Kenntnis für die Beurteilung der weiteren Versuche auf diesem Gebiete nötig ist, so will ich dieselbe hier besprechen.

Die Tatsache, um die es sich hier handelt, wurde auf folgende Weise zuerst beobachtet. Steigende Mengen von KCl, von 0,4 ccm $^{m}/_{2}$ KCl bis 1,0 ccm KCl waren in je 100 ccm H_2O gelöst worden. In jede Lösung wurden 6 Fische gebracht, und es wurde jeden Tag festgestellt, wie viele dieser Fische am Leben waren. Gleichzeitig wurden genau dieselben Lösungen von KCl, nicht in destilliertem Wasser, sondern in je 100 ccm $^{m}/_{100}$ NaCl-Lösungen hergestellt. Ich erwartete, daß der Zusatz der kleinen Menge NaCl zwar keine Entgiftung herbeiführen würde, aber daß doch die Fische in diesen letzteren Lösungen länger leben würden als in den reinen Kaliumchloridlösungen. Zu meiner Überraschung war das Gegenteil der Fall. Ich

glaubte erst, daß eine Verwechslung der Etiketten auf den Gläsern, in denen die Lösungen waren, stattgefunden hätte. Aber eine Reihe von Wiederholungen des Versuches bestätigte das Resultat, und gleichzeitig zeigten alle meine früheren, zu anderen Zwecken angestellten Versuche genau dasselbe Resultat. Das veranlaßte mich, diese sensitivierende Wirkung kleiner Dosen von NaCl etwas genauer zu untersuchen.

Als Beispiel der Erscheinung diene folgender Versuch: 0,8 ccm $^m/_2$ KCl wurden in je 100 ccm H_2O, $^1/_{100}$, $^2/_{100}$, $^3/_{100}$, $^4/_{100}$, $^5/_{100}$, $^6/_{100}$, $^7/_{100}$, $^8/_{100}$ m NaCl gelöst. Je 500 ccm der Lösung wurden in eine Schale gebracht und je 6[1]) Fische, die vorher 3 mal in Süßwasser und 1 mal in destilliertem Wasser gewaschen waren, wurden in diese Lösungen verteilt. Jeden Tag wurde die Zahl der überlebenden Fische in jeder Lösung festgestellt.

Tabelle I.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,8 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm								
	H_2O	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$	$^7/_{100}$	$^8/_{100}$ m NaCl
2	6	4	6	6	5	6	6	6	6
3	4	0	2	0	3	6	4	6	6
4	1		0		1	3	4	5	6
5	1				0	2	2	4	5
6	1					2	2	4	5
9	1					2	2	4	4

In der $^1/_{100}$, $^2/_{100}$, $^3/_{100}$, $^4/_{100}$ m NaCl-Lösung starben die Fische rascher als in der reinen KCl-Lösung. In der $^5/_{100}$ und $^6/_{100}$ m NaCl-Lösung war die Giftigkeit des KCl ungefähr die gleiche wie in der reinen KCl-Lösung ohne Zusatz von NaCl. Erst in der $^7/_{100}$ m NaCl-Lösung war die entgiftende Wirkung vorhanden. Das entspricht wieder dem früher von uns gefundenen Werte $^1/_{17}$ für den Entgiftungsquotienten von KCl durch NaCl. Solange die Lösung nur bis 10 mal so viele NaCl-Moleküle als KCl-Moleküle enthält, erhöhen die NaCl-Moleküle die Giftigkeit des KCl.

Ehe wir nun die sich hier aufdrängenden Fragen einzeln beantworten, wollen wir zuerst die Vorfrage erledigen, wie denn destilliertes Wasser und die oben angeführten NaCl-Lösungen

[1]) Gelegentlich wurden 7 Fische statt 6 in ein Gefäß gebracht.

($^1/_{100}$ m bis $^6/_{100}$ m) allein ohne KCl auf die Fische wirken. Die Tabelle II gibt eine Antwort auf diese Frage.

Tabelle II.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in						
	H_2O	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$ m NaCl
2	6	6	6	6	6	6	5
3	5	6	6	6	6	5	4
4	5	6	6	6	6	5	4
5	4	5	6	6	6	4	4
6	4	5	0	6	6	4	4
7	4	5		6	6	4	4
8	2	5		6	6	4	4
9	1	5		4	6	4	4
10	0	5		0	6	4	4
11		5			4	4	4

Der Umstand, daß die Tiere in $^2/_{100}$ und $^3/_{100}$ m NaCl am 6. resp. 10. Tage plötzlich starben, ist ein „Zufall", d. h. nicht durch die Natur der Lösung bestimmt, wie die mehrfache Wiederholung dieses Versuches ergab.[1]) Das frühere Sterben der Fische in H_2O dagegen ist kein Zufall, sondern ein häufiges, aber nicht notwendiges Resultat. Vergleicht man die Tabelle II mit Tabelle I, so sieht man, daß die schwachen NaCl-Lösungen nur in Gegenwart von KCl rasch töten, aber an sich, wie ich das schon in der voraufgehenden Abhandlung betonte, harmlos sind.

Es wurden nun Versuche mit Kaliumchloridlösungen von verschiedener Konzentration angestellt, um festzustellen, ob in allen Lösungen Zusatz von etwas NaCl die Giftwirkung von KCl erhöht. Enthielt die Lösung nur 0,3 ccm oder weniger $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung, so ließ sich die sensitivierende Wirkung von NaCl auf KCl nicht nachweisen, weil KCl in dieser Konzentration ungiftig ist. Auch bei 0,4 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung war diese Wirkung nicht immer zu erzielen. Enthielt die Lösung aber 0,5 ccm $^m/_2$ KCl oder mehr, so war die sensitivierende Wirkung vorhanden. Tabelle III und IV mögen zur Erläuterung dienen.

[1]) Die Versuche wurden in einem Zimmer angestellt, in dem die Temperatur nicht konstant war, sondern gelegentlich bis auf 22° C stieg. Das störte die Regelmäßigkeit der Resultate in einzelnen Fällen.

Tabelle III.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,3 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm						
	H_2O	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$ m NaCl
2	4	5	6	6	6	6	6
3	4	4	6	5	6	6	6
4	4	4	6	4	6	5	5
5	4	4	6	4	6	4	5
6	3	4	6	4	6	3	5
7	3	4	6	4	6	3	5
8	2	4	6	4	6	3	5

Die Tiere verhielten sich in diesem Versuche so, wie wenn das KCl nicht giftig wäre. Unwirksam ist es nicht, da der Zusatz einer so kleinen Dosis KCl das destillierte Wasser weniger giftig macht.

Tabelle IV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,5 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm							
	H_2O	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$	$^7/_{100}$ m NaCl
2	4	2	5	4	6	6	6	6
3	3	0	0	2	6	6	6	6
4	3			2	6	6	6	6
5	2			2	6	6	6	6
6	2			2	6	5	6	6
7	2			2	5	5	6	5
8	2			2	3	5	6	4

Hier ist der sensitivierende Einfluß der $^1/_{100}$ und $^2/_{100}$ Lösung von NaCl sehr deutlich bemerkbar. In der $^3/_{100}$ Lösung von NaCl ist die Giftwirkung dieselbe wie in der reinen Kaliumchloridlösung. In der $^4/_{100}$ Lösung ist die entgiftende Wirkung bereits deutlich. Der Entgiftungskoeffizient $\frac{C_K}{C_{Na}}$ ist wieder $^1/_{16}$. Die sensitivierende Wirkung tritt ein, wenn 8 mal so viel oder weniger Natriumatome als Kaliumatome vorhanden sind. Sind 12 Natriumatome auf 1 Kaliumatom in der Lösung, so ist weder eine Sensitivierung noch eine Entgiftung wahrnehmbar.

Es fragte sich nun, ob auch bei höherer Konzentration von KCl die sensitivierende Wirkung von NaCl noch nachweisbar bleibt. Das ist der Fall, nur ist zu berücksichtigen, daß auch schon in einer reinen Kaliumchloridlösung dieses Salz bei höheren Konzentrationen die Fische rasch tötet. Dennoch läßt sich zeigen, daß ein Zusatz einer zur Entgiftung unzureichenden

Menge von NaCl die Giftwirkung beschleunigt, wie Tabelle V und VI zeigen.

Tabelle V.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,0 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm							
	H_2O	$^1/_{200}$	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^4/_{100}$	$^1/_{16}$	$^1/_8$	$^2/_{16}$ m NaCl
2	5	0	0	0	1	0	2	3
3	3				0		0	3
4	0							3
5								3

Tabelle VI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 3,0 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm									
	H_2O	$^1/_{200}$	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^4/_{100}$	$^1/_{16}$	$^1/_8$	$^2/_{16}$	$^1/_4$	$^2/_8$ m NaCl
2	3	0	1	1	2	1	0	1	4	7
3	2		0	0	0	0		0	2	7
4	0								1	4
5									1	4

In Tabelle V und VI tritt die sensitivierende Wirkung des NaCl ein, sobald der Quotient $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}} \geqq \frac{1}{10}$ ist.

Wir sehen also, daß die sensitivierende Wirkung von NaCl-Lösungen auf KCl-Lösungen, solange die molekulare Konzentration der NaCl-Lösung kleiner als 10 mal so groß ist wie die der KCl-Lösung, auch bei größeren Konzentrationen von KCl auftritt. Diese sensitivierende Wirkung ist dafür verantwortlich, daß wir den scharfen Grenzwert für die entgiftende Konzentration der NaCl-Lösung erhalten, den wir in der voraufgehenden Arbeit geschildert haben.

Die nächste Frage, die erledigt werden mußte, war die nach der niedrigsten Konzentration, die die NaCl-Lösung haben darf, um auf die Kaliumchloridlösung sensitivierend zu wirken. Wie Tabelle V und VI zeigen, reicht schon eine $^1/_{200}$ m NaCl-Lösung dafür aus; ebenso habe ich mit $^1/_{400}$ m NaCl-Lösungen noch sensitivierende Wirkungen erhalten.

Die folgenden Tabellen geben ein Bild dieser Tatsache. Die in Tabelle VII, VIII, IX, X und XI mitgeteilten Versuche wurden gleichzeitig, also bei derselben Temperatur und demselben Material angestellt. In der ersten Reihe handelte es sich um reine KCl-Lösungen von verschiedener Konzentration.

In den Tabellen VIII, IX, X, und XI um KCl-Lösungen von derselben Konzentration wie in Tabelle VII, aber nicht in H_2O,

Tabelle VII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm H_2O							
	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5
2	5	6	6	6	3	5	6	4
3	4	5	6	5	3	5	5	3
4	4	4	5	5	3	3	5	2
5	4	4	4	3	1	3	4	1
6	4	4	4	3	1	3	3	1
7	3	4	3	2	1	1	3	1
8	3	4	1	1	1	0	3	0
9	3	4	1	1	0		3	
10	3	4	1	1			3	
13	2	2	0	1				

Tabelle VIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm $^m/_{400}$ NCl							
	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5
2	6	6	5	6	6	6	6	5
3	6	6	5	6	5	4	4	5
4	4	4	5	3	2	1	1	2
5	1	2	5	2	1	0	1	0
6	1	1	1	1	0		0	
7	0	0	0	1				
8				1				
9				1				
10				1				
11				0				

Tabelle IX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm $^m/_{200}$ NaCl							
	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5
2	5	6	6	6	5	5	6	5
3	3	6	6	4	5	3	2	1
4	1	4	1	2	0	0	1	0
5	1	0	1	0			0	
6	1		1					
7	1		1					
8	1		1					
9	1		1					
10	1		1					
13	1		1					

sondern in $^m/_{400}$, $^m/_{200}$, $^m/_{100}$ und $^m/_{50}$ NaCl. Man sieht, daß die Zahl der überlebenden Fische größer ist in den reinen KCl-Lösungen (Tabelle VII) als in den Lösungen, die kleine Mengen NaCl enthalten (siehe besonders Tabellen X und XI). Das ist namentlich für Lösungen mit mehr als 0,5 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm deutlich.

Tabelle X.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm $^m/_{100}$ NaCl							
	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5
2	5	6	6	6	6	6	5	4
3	4	6	5	4	4	2	5	2
4	3	1	2	1	0	2	0	0
5	1	0	1	0		0		
6	1		0					
7	1							
8	1							
9	1							
10	1							
13	1							

Tabelle XI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm $^m/_{50}$ NaCl							
	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5
2	6	7	6	6	6	6	6	3
3	6	5	3	3	3	3	3	0
4	4	3	0	0	0	0	0	
5	3	3						
6	1	3						
7	1	3						
8	1	3						
9	1	3						
10	1	3						
13	1	2						

Die sensitivierende Wirkung der NaCl-Lösung steigt mit der Konzentration der letzteren, sie ist am größten für die $^m/_{50}$ und am kleinsten für die $^m/_{400}$. Dabei ist natürlich zu berücksichtigen, daß für KCl-Lösungen sehr niedriger Konzentration, bei steigender Konzentration des NaCl, sehr bald die Grenze erreicht ist, bei der die sensitivierende Wirkung aufhört. So wirkt eine $^m/_{100}$ NaCl-Lösung noch sensitivierend auf eine Lösung, die 0,5 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung

enthält, eine $^m/_{50}$ NaCl-Lösung aber wirkt kaum mehr sensitivierend. Hier ist nämlich das kritische Verhältnis von 8 Molekülen NaCl zu 1 Molekül KCl erreicht, bei dem die antagonistische Wirkung des NaCl auf KCl beginnt. Dieses kritische Verhältnis ist für höhere Konzentrationen von KCl vermutlich ein wenig höher als für sehr niedrige und fast ungiftige Konzentrationen von KCl.

Man erhält nun derartige sensitivierende Wirkungen nicht nur mit NaCl, sondern auch mit Na_2SO_4. Die Tabellen XII und XIII illustrieren das. Beide Versuche wurden gleichzeitig angestellt. Die Konzentration von KCl war in beiden Versuchen die gleiche, nämlich 1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung; nur war das sensitivierende Salz in einem Falle NaCl, im anderen Na_2SO_4.

Tabelle XII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm							
	H_2O	$^m/_{1600}$	$^m/_{800}$	$^m/_{400}$	$^m/_{200}$	$^m/_{100}$	$^m/_{50}$	$^m/_{25}$ Na_2SO_4
1	7	6	6	6	6	6	6	6
2	6	6	6	5	4	3	6	6
3	3	1	3	1	1	0	0	4
4	2	0	1	0	0			3
5	2		1					1
6	2		0					1
7	2							1
8	2							1
9	2							1

Tabelle XIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm							
	H_2O	$^1/_{400}$	$^1/_{200}$	$^1/_{100}$	$^1/_{50}$	$^1/_{25}$	$^2/_{25}$	$^3/_{25}$ m NaCl
1	7	6	6	6	6	6	6	6
2	6	5	4	5	4	5	6	6
3	3	0	0	0	1	0	6	5
4	2				0		2	5
5	2						2	5
6	2						2	5
7	2						2	5
8	2						2	4
9	2						2	3

In Tabelle XIII wirkt die NaCl-Lösung sensitivierend auf die Giftwirkung von KCl, solange nur $^1/_2$ bis 8 Moleküle NaCl auf 1 Molekül KCl in der Lösung vorhanden sind; und in

Tabelle XII wirkt die Na_2SO_4-Lösung sensitivierend, solange nur $^1/_8$ bis 4 Moleküle Na_2SO_4 auf 1 Molekül KCl in der Lösung vorhanden sind. Nimmt man an, daß das Na-Ion die sensitivierende Wirkung ausübt, so sind die Grenzwerte bei der Anwendung von Na_2SO_4 und NaCl identisch. (Der Wert für H_2O ist in Tabelle XIII aus Tabelle XII wiederholt worden, um dem Leser die Übersicht zu erleichtern.) Da der Verdacht entstand, daß vielleicht eine Verunreinigung des NaCl die Sensitivierung bedingen könne, so wurde NaCl verschiedener Herkunft versucht. Kahlbaums Marke „Zur Analyse" und Mercks „Highest Purity" gaben dieselben Resultate. Es gelang nicht, mittels $MgCl_2$ und $CaCl_2$ in Konzentrationen von $^m/_{800}$ und darüber die Giftwirkung von KCl zu verstärken.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Es wird gezeigt, daß der Zusatz von NaCl zu einer Kaliumchloridlösung die Giftwirkung des Kaliums auf Fundulus beschleunigt, solange weniger als 8 oder 10 Moleküle NaCl auf 1 Molekül KCl in der Lösung sind.

2. Sobald 17 oder mehr Moleküle NaCl auf 1 Molekül KCl vorhanden sind, tritt die umgekehrte Erscheinung ein, nämlich die Entgiftung des Kaliums, wie in der voraufgehenden Arbeit ausgeführt wurde.

3. Wie Versuche mit Na_2SO_4 zeigen, scheint die sensitivierende wie die entgiftende Wirkung von NaCl auf KCl vom Na-Ion auszugehen.

4. Die Konzentrationen von NaCl, die imstande sind, die Giftwirkung von KCl zu verstärken, sind an sich völlig ungiftig, da die Fische in denselben beliebig lange leben können.

Über den Restkohlenstoff des menschlichen Blutes unter normalen und pathologischen Verhältnissen.

Von

Stefano Mancini.

(Aus den R. Ospedali Riuniti in Livorno.)

(Eingegangen am 21. März 1911.)

Vor kurzem habe ich[1]) eine Reihe von Versuchen über die Bestimmung des Restkohlenstoffs, d. h. der Menge von Kohlenstoff, die nach Entfernung aller eiweißartigen Bestandteile und der Kohlensäure zurückbleibt, im Blute verschiedener Säugetiere, veröffentlicht.

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure ermöglichte die vollständige Entfernung der Proteinstoffe aus dem Blut, und die Methode von Messinger in der Form, wie sie von Spiro für die Bestimmung des Harnkohlenstoffs benutzt wird, erwies sich als sehr geeignet zur quantitativen Bestimmung des im Filtrat zurückgebliebenen Kohlenstoffs.

Diese Untersuchungen, die ich im Laboratorium von Herrn Prof. Hofmeister ausführte, ergaben folgende Resultate:

1. Der Restkohlenstoff im normalen Blut ist dosierbar.

2. Der Restkohlenstoff ist bei verschiedenen Arten von Säugetieren ungefähr in derselben Menge vorhanden. Ich fand nämlich für den in 100 ccm enthaltenen Restkohlenstoff folgende Durchschnittszahlen: Hund 0,0780 g, Pferd 0,0756 g, Ochse 0,0892 g, Kaninchen 0,0844 g.

3. Der Restkohlenstoff nimmt nach dem Aderlaß, bei der Phosphorvergiftung und infolge der Unterbindung beider Uretheren zu.

---

[1]) Diese Zeitschr. 26, 149, 1910.

Die Zuverlässigkeit der Methode und die erhaltenen Resultate legten den Gedanken nahe, solche Untersuchungen auch am menschlichen Blute im gesunden Zustande und bei verschiedenen Krankheiten auszuführen.

Methode.

Aus einer Armvene wurden vermittels einer Grawitzschen Hohlnadel 50 ccm Blut entnommen und in einem 50 ccm einer 10%igen Fluornatriumlösung enthaltenden Meßzylinder aufgefangen. Dieses Gemisch wurde mit 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und dann mit 100 ccm einer 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure behandelt.

Das Ganze wurde filtriert und das ganz klare Filtrat in 2 gleiche Teile geteilt, die somit je 25 ccm Blut entsprachen. In denselben wurde nach der früher beschriebenen Methode der Gehalt an Kohlenstoff durch Überführung in CO_2 bestimmt.

Verhalten des Restkohlenstoffs im normalen Menschenblute.

Versuch 1. Gesunder, 59 Jahre alter Mann. Gemischte Kost. Blutentnahme $^1/_2$ Stunde nach der Mittagsmahlzeit.

Blut 25 ccm = 0,0670 g CO_2 = 0,2680% } 0,2780% CO_2
„ 25 ccm = 0,0720 g CO_2 = 0,2880% } = 0,0758% C.

Versuch 2. Gesunder, 32 Jahre alter Mann. Milchdiät. Blutentnahme morgens bei leerem Magen.

Blut 25 ccm = 0,0670 g CO_2 = 0,2680% } 0,2723% CO_2
„ 25 ccm = 0,0690 g CO_2 = 0,2760% } = 0,0742% C.

Versuch 3. Gesunder Mann, 30 Jahre alt. Milchdiät. Blutentnahme morgens, 1 Stunde nach Verabreichung von 500 g Milch.

Blut 25 ccm = 0,0680 g CO_2 = 0,2720% } 0,2700% CO_2
„ 25 ccm = 0,0678 g CO_2 = 0,2680% } = 0,0731% C.

Versuch 4. Gesunder Mann, 35 Jahre alt. Gemischte Kost. Blutentnahme 2 Stunden nach der Mittagsmahlzeit.

Blut 25 ccm = 0,0756 g CO_2 = 0,3024% } 0,2912% CO_2
„ 25 ccm = 0,0700 g CO_2 = 0,2800% } = 0,0794% C.

Versuch 5. Gesunder Mann, 33 Jahre alt. Gemischte Kost. Blutentnahme morgens bei leerem Magen.

Blut 25 ccm = 0,0780 g CO_2 = 0,3120% } 0,3060% CO_2
„ 25 ccm = 0,0750 g CO_2 = 0,3000% } = 0,0834% C.

Versuch 6. Gesunde Frau, 31 Jahre alt. Gemischte Kost. Blutentnahme morgens bei leerem Magen.

Blut 25 ccm = 0,0660 g CO_2 = 0,2640% } 0,2720% CO_2
„ 25 ccm = 0,0700 g CO_2 = 0,2800% } = 0,0736% C.

Verhalten des Restkohlenstoffs im menschlichen Blute bei verschiedenen Krankheitsprozessen.

Versuch 7. Mann im Alter von 45 Jahren, leidend an Maltafieber. Fiebert seit etwa 3 Monaten. Temperatur im Augenblicke der Blutentnahme 39,2° C.

Blut 25 ccm = 0,1070 g CO_2 = 0,4280% } 0,4160% CO_2
„ 25 ccm = 0,1010 g CO_2 = 0,4040% } = 0,1149% C.

Versuch 8. Mann, 35 Jahre alt, mit Angina follicularis. Temperatur im Augenblicke der Blutentnahme 38,9° C.

Blut 25 ccm = 0,0770 g CO_2 = 0,3080% } 0,3080% CO_2
„ 25 ccm = 0,0770 g CO_2 = 0,3080% } = 0,0843% C.

Versuch 9. Mann, 24 Jahre alt, mit Malariafieber (Sommerherbsttypus). Temperatur im Augenblick der Blutentnahme 39,3° C.

Blut 25 ccm = 0,0820 g CO_2 = 0,3280% } 0,3220% CO_2
„ 25 ccm = 0,0790 g CO_2 = 0,3160% } = 0,0877% C.

Versuch 10. Mann, 28 Jahre alt, mit akutem Gelenkrheumatismus. Kein hohes Fieber.

Blut 25 ccm = 0,0670 g CO_2 = 0,2680% } 0,2740% CO_2
„ 25 ccm = 0,0700 g CO_2 = 0,2800% } = 0,0747% C.

Versuch 11. Mann, 27 Jahre alt, mit modulärer, beiderseitiger Bronchopneumonie. Blutentnahme am 6. Krankheitstage. Exitus letalis am 9. Krankheitstage.

Blut 25 ccm = 0,1120 g CO_2 = 0,4480% } 0,4640% CO_2
„ 25 ccm = 0,1200 g CO_2 = 0,4800% } = 0,1240% C.

Versuch 12. Mann, 28 Jahre alt, mit lobärer, fibrinöser Pneumonie. Blutentnahme am 3. Krankheitstage. Krisis am 9. Krankheitstage.

Blut 25 ccm = 0,0770 g CO_2 = 0,3080% } 0,3040% CO_2
„ 25 ccm = 0,0750 g CO_2 = 0,3000% } = 0,0829% C.

Versuch 13. Frau, 42 Jahre alt, mit lobärer, fibrinöser Pleuropneumonie. Blutentnahme am 6. Krankheitstage. Krisis erfolgt am 8. Krankheitstage.

Blut 25 ccm = 0,0900 g CO_2 = 0,3600% } 0,3420% CO_2
„ 25 ccm = 0,0810 g CO_2 = 0,3240% } = 0,0933% C.

Versuch 14. Mann, 45 Jahre alt, mit lobärer, fibrinöser Pleuropneumonie. Blutentnahme am 10. Krankheitstage, als die ersten physischen Zeichen der Resolution des pneumonitischen Herdes auftreten. Krisis am 12. Krankheitstage.

Blut 25 ccm = 0,0920 g CO_2 = 0,3680% } 0,3800% CO_2
„ 25 ccm = 0,0980 g CO_2 = 0,3920% } = 0,1061% C.

Versuch 15. Mann, 40 Jahre alt, mit Meningitis purulenta. Wenig ausgesprochener Symptomenkomplex. Temperatur 38,2° C. Myosis pupillaris, Nackensteifigkeit, verlangsamter Puls (55 P. i. d. Minute), Cerebrospinalflüssigkeit etwas trübe. Citodiagnose: Spärliche Diplokokken, Lymphocyten, zahlreiche polymorphkernige neutrophile L. Blutentnahme am

6. Krankheitstage. Subakuter Verlauf. Exitus letalis nach 3 Krankheitsmonaten.

Blut 25 ccm = 0,0630 g CO_2 = 0,2520% } 0,2500% CO_2
„ 25 ccm = 0,0620 g CO_2 = 0,2480% } = 0,0681% C.

Versuch 16. Mann, 35 Jahre alt, mit Abdominaltyphus. Regelmäßiger Verlauf. Blutentnahme am Anfang der 4. Krankheitswoche.

Blut 25 ccm = 0,0760 g CO_2 = 0,3040% } 0,3070% CO_2
„ 25 ccm = 0,0790 g CO_2 = 0,3100% } = 0,0837% C.

Versuch 17. Mann, 40 Jahre alt, mit Abdominaltyphus. Regelmäßiger Verlauf. Blutentnahme am Anfang der 3. Krankheitswoche.

Blut 25 ccm = 0,0800 g CO_2 = 0,3200% } 0,3140% CO_2
„ 25 ccm = 0,0770 g CO_2 = 0,3080% } = 0,0856% C.

Versuch 18. Mann, 45 Jahre alt, mit kryptogenetischem, wenige Stunden dauerndem Fieber. Temperatur im Augenblicke der Blutentnahme 39,8° C.

Blut 25 ccm = 0,0700 g CO_2 = 0,2800% } 0,2840% CO_2
„ 25 ccm = 0,0720 g CO_2 = 0,2880% } = 0,0774% C.

Versuch 19. Chronischer Ikterus infolge sekundärem Lebercarcinom (primärer Magenkrebs). Nekroskopie.

Blut 25 ccm = 0,0920 g CO_2 = 0,3680% } 0,3640% CO_2
„ 25 ccm = 0,0900 g CO_2 = 0,3600% } = 0,0995% C.

Versuch 20. Ikterus und Ascites. Magencarcinom mit Metastase in den Lymphknoten des Leberhilus. Nekroskopie.

Blut 25 ccm = 0,0960 g CO_2 = 0,3840% } 0,3960% CO_2
„ 25 ccm = 0,1020 g CO_2 = 0,4080% } = 0,1109% C.

Versuch 21. Frau, 84 Jahre alt. Chronischer Ikterus infolge von narbigem Verschluß des Ductus choledochus. Nekroskopie.

Blut 25 ccm = 0,0800 g CO_2 = 0,3200% } 0,3240% CO_2
„ 25 ccm = 0,0820 g CO_2 = 0,3280% } = 0,0880% C.

Versuch 22. Atrophische Lebercirrhose mit Ascites.

Blut 25 ccm = 0,0760 g CO_2 = 0,3040% } 0,3140% CO_2
„ 25 ccm = 0,0810 g CO_2 = 0,3240% } = 0,0856% C.

Versuch 23. Atrophische Lebercirrhose mit Ascites.

Blut 25 ccm = 0,0900 g CO_2 = 0,3600% } 0,3580% CO_2
„ 25 ccm = 0,0890 g CO_2 = 0,3560% } = 0,0976% C.

Versuch 24. Mann, 58 Jahre alt, Magencarcinom mit Metastasen in der Leber.

Blut 25 ccm = 0,0830 g CO_2 = 0,3320% } 0,3420% CO_2
„ 25 ccm = 0,0880 g CO_2 = 0,3520% } = 0,0933% C.

Versuch 25. Mammacarcinom mit Drüsenmetastasen und sehr ausgesprochener Kachexie.

Blut 25 ccm = 0,0920 g CO_2 = 0,3680% } 0,3740% CO_2
„ 25 ccm = 0,0950 g CO_2 = 0,3800% } = 0,1020% C.

Versuch 26. Mann, 34 Jahre alt. Chronische Gastritis infolge von Alkoholmißbrauch, mit Erscheinungen von Leberhyperämie.

Blut 25 ccm = 0,0880 g CO_2 = 0,3520% } 0,3600% CO_2
„ 25 ccm = 0,0920 g CO_2 = 0,3680% } = 0,0990% C.

Versuch 26a. Derselbe Patient nach 4wöchiger Milchdiät.

Blut 25 ccm = 0,0700 g CO_2 = 0,2800% } 0,2840% CO_2
„ 25 ccm = 0,0720 g CO_2 = 0,2880% } = 0,0774% C.

Versuch 27. Mann, 70 Jahre alt. Darmverschluß infolge von Carcinom. Nekroskopie.

Blut 25 ccm = 0,0780 g CO_2 = 0,3120% } 0,3160% CO_2
„ 25 ccm = 0,0800 g CO_2 = 0,3200% } = 0,0862% C.

Versuch 28. Mann, 40 Jahre alt. Aneurysma des Aortenbogens.

Blut 25 ccm = 0,0700 g CO_2 = 0,2800% } 0,2820% CO_2
„ 25 ccm = 0,0710 g CO_2 = 0,2840% } = 0,0769% C.

Versuch 29. Mitralstenose und Insuffizienz, Myocarditis, Hyposystolie.

Blut 25 ccm = 0,0730 g CO_2 = 0,2920% } 0,2920% CO_2
„ 25 ccm = 0,0730 g CO_2 = 0,2920% } = 0,0796% C.

Versuch 30. Mann, 64 Jahre alt. Interstitielle Nephritis, arterieller Blutdruck, mit Riva-Roccis Sphygmomanometer gemessen, 220 mm Hg.

Blut 25 ccm = 0,0870 g CO_2 = 0,3480% } 0,3340% CO_2
„ 25 ccm = 0,0800 g CO_2 = 0,3200% } = 0,0910% C.

Versuch 31. Frau, 67 Jahre alt. Parenchymatöse chronische Nephritis. (Arterieller Blutdruck 166 mm Hg).

Blut 25 ccm = 0,0630 g CO_2 = 0,2520% } 0,2560% CO_2
„ 25 ccm = 0,0650 g CO_2 = 0,2600% } = 0,0731% C.

Versuch 32. Mann, 60 Jahre alt. Interstitielle Nephritis. (Arterieller Blutdruck 200 mm Hg.)

Blut 25 ccm = 0,0820 g CO_2 = 0,3280% } 0,3160% CO_2
„ 25 ccm = 0,0760 g CO_2 = 0,3040% } = 0,0862% C.

Versuch 33. Frau, 54 Jahre alt. Akute Urämie mit konvulsivischen Erscheinungen. Nekroskopie, harte, rote Schrumpfniere.

Blut 25 ccm = 0,1160 g CO_2 = 0,4640% } 0,4760% CO_2
„ 25 ccm = 0,1220 g CO_2 = 0,4880% } = 0,1298% C.

Versuch 34. Mann, 48 Jahre alt. Akute Urämie mit konvulsivischen Erscheinungen. Erste Blutentnahme nach einem Krampfanfall. Zweite während des Koma. Pathologisch-anatomischer Befund: rote, harte Schrumpfniere.

Blut 25 ccm = 0,0980 g CO_2 = 0,3920% } 0,4080% CO_2
„ 25 ccm = 0,1060 g CO_2 = 0,4240% } = 0,1115% C.
Blut 25 ccm = 0,1060 g CO_2 = 0,4240% } 0,4360% CO_2
„ 25 ccm = 0,1120 g CO_2 = 0,4480% } = 0,1189% C.

Versuch 35. Mann, 36 Jahre alt. Akute Urämie. Pathologisch-anatomischer Befund: Hypertrophische Lebercirrhose: Schrumpfniere.

Blut 25 ccm = 0,1000 g CO_2 = 0,4000% } 0,3880% CO_2
„ 27 ccm = 0,0940 g CO_2 = 0,3760% } = 0,1085% C.

Versuch 36. Erstgebärende am Anfang des 9. Schwangerschaftsmonats. Zahlreiche eklamptische Anfälle. Spontane Geburt eines toten Kindes. Eiweißgehalt des Harnes 5‰. Blutentnahme nach einem Krampfanfall. Ausgang: Heilung.

Blut 25 ccm = 0,1170 g CO_2 = 0,4680% } 0,4360% CO_2
„ 25 ccm = 0,1070 g CO_2 = 0,4040% } = 0,1220% C.

Versuch 37. Frau in dritter Schwangerschaft. Mehrfache eklamptische Anfälle. Die Schwangerschaft wird künstlich unterbrochen. Anurie während des Anfalles. Blutentnahme während der Anurie unmittelbar nach einem konvulsivischen Anfall. Ausgang: Heilung.

Blut 25 ccm = 0,1225 g CO_2 = 0,4900% } 0,4750% CO_2
„ 25 ccm = 0,1150 g CO_2 = 0,4600% } = 0,1290% C.

Versuch 38. Erstgebärende, am Ende des 8. Schwangerschaftsmonats. Einzelne wenige eklamptische Anfälle. Spontane Geburt. Eiweiß 6‰. Blutentnahme nach dem ersten konvulsivischen Anfall. Ausgang: Heilung.

Blut 25 ccm = 0,0850 g CO_2 = 0,3400% } 0,3300% CO_2
„ 25 ccm = 0,0800 g CO_2 = 0,3200% } = 0,0906% C.

Versuch 39. Mann, 60 Jahre alt. Wird ins Spital infolge von apoplektischem Koma aufgenommen. Pathologisch-anatomischer Befund: Hämorrhagie in die innere Kapsel der linken Hemisphäre mit Beteiligung der Ventrikel.

Blut 25 ccm = 0,0750 g CO_2 = 0,3000% } 0,2940% CO_2
„ 25 ccm = 0,0720 g CO_2 = 0,2880% } = 0,0800% C.

Versuch 40. Frau, 30 Jahre alt. Hysterische Krämpfe. Blutentnahme unmittelbar nach einem Anfall.

Blut 25 ccm = 0,0730 g CO_2 = 0,2920% } 0,2860% CO_2
„ 25 ccm = 0,0700 g CO_2 = 0,2800% } = 0,0780% C.

Versuch 41. Frau, 45 Jahre alt. Kryptogenetische Anämie. Ausgang: Heilung.

Blut 25 ccm = 0,0790 g CO_2 = 0,3160% } 0,3080% CO_2
„ 25 ccm = 0,0750 g CO_2 = 0,3000% } = 0,0839% C.

Versuch 42. Frau, 52 Jahre alt. Magencarcinom mit Lebermetastasen und sehr ausgesprochener Kachexie.

Blut 25 ccm = 0,0910 g CO_2 = 0,3640% } 0,3580% CO_2
„ 25 ccm = 0,0880 g CO_2 = 0,3520% } = 0,0975% C.

Versuch 43. Frau, 62 Jahre alt. Magencarcinom mit Metastasen im Omentum.

Blut 25 ccm = 0,0940 g CO_2 = 0,3700% } 0,3890% CO_2
„ 25 ccm = 0,1020 g CO_2 = 0,4080% } = 0,1058% C.

Aus obigen Untersuchungen geht hervor, daß das normale menschliche Blut im Durchschnitt 0,0765 g Restkohlenstoff pro 100 ccm enthält, also annähernd dieselbe Menge, wie ich sie beim Blut des Hundes und des Pferdes gefunden hatte.

Dagegen fand ich eine geringe Zunahme des Restkohlenstoffes bei verschiedenen Krankheiten und eine erhebliche Zunahme in 1 Fall von Maltafieber, in 1 Fall von Diplokokken-Bronchopneumonie, in 3 Fällen von fibrinöser Pleuropneumonie, bei Lebercirrhose mit Ascites, in allen von mir beobachteten Krebsfällen, bei interstitieller Nephritis und besonders bei Urämie und Eklampsie.

Diese Resultate legen den Gedanken nahe, daß die Zunahme des Restkohlenstoffs auf eine Zunahme der im Blute enthaltenen kolloidalen Stoffe zurückzuführen ist.

Diese Zunahme kann auf doppeltem Wege zustande kommen, d. h. entweder durch eine reichlichere Erzeugung von kolloidalen Stoffen, die aus dem Gewebe in die Lymphe und in das Blut übergehen, oder durch eine verlangsamte, gehemmte Ausscheidung derselben.

In den Fällen von Pleuro- und von Bronchopneumonie konnte die von mir beobachtete Zunahme des Restkohlenstoffs bedingt sein durch eine Vermehrung von in den Kreislauf eindringenden kolloidalen Stoffen, die durch Proteolyse in dem Exsudate gebildet werden.

In den Fällen von Lebercirrhose mit Ascites hängt die Zunahme hingegen höchstwahrscheinlich mit der teilweisen Resorption des Transsudates und mit den schweren Stoffwechselstörungen zusammen, die man im letzten Stadium dieser Krankheit stets vorfindet.

Bei dem Carcinom kann die übernormale Erzeugung von kolloidalen Stoffen auf doppeltem Wege zustande kommen, nämlich einerseits durch die durch die Geschwulst bewirkte Veränderung des Stoffwechsels und andererseits durch in der Geschwulst sich abspielende autolytische Prozesse.

In dem Fall von Maltafieber, in dem ich eine Vermehrung des Restkohlenstoffs beobachtete, war der seit ungefähr 3 Monaten fiebernde Patient sehr herabgekommen und befand sich in einem derartig schlechten Ernährungszustande, daß er das Bild der sog. Fieberkachexie aufwies. Hier hing die Vermehrung der kolloidalen Stoffe unzweifelhaft mit dem Gewebszerfall zusammen.

Auch ein die Ausscheidung der kolloidalen Stoffe hindernder Umstand hat eine Ansammlung derselben im Blute zur Folge,

wie ich in meiner vorigen Arbeit durch die Unterbindung der Uretheren bei Kaninchen nachweisen konnte. Einen solchen Umstand treffen wir auch auf klinischem Gebiete bei der interstitiellen Nephritis und bei der Urämie an.

Bei der Urämie, diesem Symptomenkomplex mit noch so dunkler Pathogenese, ist die Zunahme des Reststickstoffs wahrscheinlich nicht nur auf die Niereninsuffizienz, sondern auch auf weitere noch unbekannte Faktoren zurückzuführen.

Die Zunahme der kolloidalen Stoffe im Blute der Eklampsiekranken bestätigt und ergänzt die Resultate, die Savaré[1]) bei seinen Untersuchungen über den Gehalt des Urins an nicht dialysierbaren Stoffen erhalten hat. Ich bin der Ansicht, daß bei diesem Symptomenkomplex resp. bei dieser Krankheitsform diese Stoffe von den Produkten des Stoffwechsels des Embryos und der schwangeren Gebärmutter herstammen.

Ich glaube meinen Untersuchungen ein gewisses Interesse zuschreiben zu können, bin aber der Ansicht, daß es erforderlich wäre, diese Untersuchungsmethode auf klinischem Gebiete in weiterem Umfange anzuwenden und besonders zu erforschen, wie sich der Restkohlenstoff bei den verschiedenen Formen von Kachexie verhält, und das Verhalten desselben in weiteren Fällen von Urämie und von Eklampsie zu untersuchen.

Vermutlich handelt es sich um verschiedene Stoffe, die sich dabei im Blute anhäufen, so bei der Pneumonie um das Mucoid, das Ebbecke[2]) bei der croupösen Pneumonie im Harn gefunden hat, bei der Urämie vielleicht um eine Vermehrung von kolloidalen Stoffen, die unter normalen Verhältnissen im Harn zur Ausscheidung kommen.

Die wichtigste Fortsetzung der Arbeit wäre eine genaue Untersuchung der Natur der kolloidalen Körper. Doch dürfte dies wegen der geringen Mengen, um die es sich handelt, schwierig sein.

---

[1]) M. Savaré, Der Gehalt des Frauenharns an adialysablen Stoffen unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9, Heft 8 bis 11, S. 401.

[2]) M. Ebbecke, Über die Ausscheidung nicht dialysabler Stoffe durch den Harn unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Diese Zeitschr. 12, 485.

Bemerkungen zu der Arbeit von B. Slowtzoff:

Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern.

(Diese Zeitschr. 31, 227, 1911.)

Von

J. Wohlgemuth.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Kgl. Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 12. März 1911.)

In der oben genannten Arbeit teilt Slowtzoff als das wesentlichste Ergebnis seiner Untersuchungen mit, daß bei Phosphorvergiftung der Zerfall des Lebereiweißes hauptsächlich bedingt ist durch den Abbau nichtphosphorhaltiger Eiweißkörper, daß das Kerneiweiß viel beständiger ist und bis zu dem Tode der Tiere wenig angegriffen bleibt.

Zu einem ganz gleichen Resultat bin ich bereits vor fast 5 Jahren gekommen und habe darüber in dieser Zeitschr. 1, 161 unter dem Titel „Zur Chemie der Phosphorleber" ausführlich berichtet. Ich hatte meine Untersuchungen nicht wie Sl. an Hunden, sondern an Kaninchen angestellt, die ich ebenfalls durch subcutane Injektion von Phosphoröl vergiftet hatte. In der Leber dieser Tiere — die Organe wurden, nachdem sie zuvor von Blut befreit waren, mit Alkohol und Äther erschöpfend behandelt und zu einem feinen, vollkommen gleichmäßigen Pulver verarbeitet — bestimmte ich den Stickstoff, den Phosphor und den Schwefel und verglich die gefundenen Werte mit den entsprechenden Zahlen, die ich für die von normalen Kaninchen stammenden Lebern zuvor ermittelt hatte. Dabei stellte sich heraus, daß, während der Stickstoffgehalt in den Phosphorlebern beträchtlich abgenommen hatte, der Phosphorgehalt fast unverändert geblieben war, und zwar hatte sich für die Leber der normalen Tiere ein Phosphorgehalt ergeben von durchschnittlich 1,82% (N = 11,42%), für die vergifteten Tiere von durchschnittlich 1,77% (N = 7,26%). Ich hatte daraus den Schluß gezogen, daß das Kerneiweiß den in der Phosphorleber sich abspielenden destruktiven Prozessen weit länger widersteht als das Protoplasmaeiweiß, und gleichzeitig darauf hingewiesen, daß sich dieser chemische Befund mit dem histologischen Bild vollkommen deckt, insofern als man auch mikroskopisch in der Phosphorleber die Zellkerne meist dann noch gut erhalten findet, wenn das Protoplasma schon fast vollkommen vom Fett verdrängt ist.

Da diese meine Publikation Slowtzoff entgangen zu sein scheint, sei auf sie hiermit noch einmal hingewiesen.

Über die Zusammensetzung der durch Hefepreßsaft gebildeten Hexosephosphorsäure. I.

Von

A. Harden und W. J. Young.

(Aus dem Biochemical Department of the Lister Institute London.)

(Eingegangen am 22. März 1911.)

Im Jahre 1905 zeigten die Verfasser[1]), daß, wenn man zu einem Gärungsgemisch, aus Glucose und Hefepreßsaft bestehend, ein lösliches Phosphat zusetzt, die Gärung bedeutend aktiviert wird. Diese Erscheinung ist aber nur vorübergehend, die Gärung erreicht bald eine konstante Größe, die nur wenig höher ist als die Gärung des ursprünglichen Gemisches ohne Phosphat. Es wurde gezeigt, daß am Ende der Periode der vermehrten Gärung das Phosphat nicht mehr durch Magnesiumcitratgemisch gefällt werden konnte. In einer Serie von späteren Arbeiten[2]) kamen die Verfasser zu der Ansicht, daß es sich um eine Bildung eines Phosphorsäureesters handelt. Die Reaktion kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,R'_2HPO_4 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4R'_2)_2 + 2\,H_2O.$$

Ähnliche Erscheinungen wurden auch bei der Gärung von Fructose und Mannose unter denselben Bedingungen beobachtet.

Im Jahre 1907 erschien nun eine Arbeit von Iwanoff[3]), in der er angibt, daß während der Gärung von Glucose und Fructose durch Zymin, in Gegenwart von Natriumphosphat, organische Phosphorverbindungen entstehen, die in Form von Kupfersalzen isoliert

[1]) Proc. of the Chem. Soc. 21, 189, 1905.

[2]) Proc. Roy. Soc. B. 77, 417, 1906; 80, 299, 1908; 81, 336, 1909; Proc. of the Chem. Soc. 24, 115, 1908.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 281, 1907.

wurden. Seiner Meinung nach waren es Verbindungen einer Triose und Phosphorsäure, und er erhielt mit Phenylhydrazin zwei Osazone, die bei 142° resp. bei 125° schmolzen. In einer späteren Mitteilung[1]) kam Iwanoff zu der Ansicht, daß beide Osazone identisch waren, und daß beide nach dem Umkrystallisieren aus Benzol bei 127° schmolzen. Die Analyse zeigte, daß es sich um ein Trioseosazon handelte. Er betrachtet deswegen diese Verbindung als eine Triosephosphorsäure. Im Jahre 1907 beschrieb Young[2]) die Isolierung dieser Phosphorverbindungen mit Hilfe der Bleisalze, deren empirische Zusammensetzung $C_3H_5O_2(PO_4Pb)$ war. v. Lebedew[3]) beschreibt ebenfalls die Isolierung dieses Phosphorsäureesters mit Hilfe von Aceton und findet, daß diese Verbindung mit Phenylhydrazin ein Osazon von der Formel $C_{24}H_{29}O_6N_6P$ liefert, die er als ein Phenylhydrazid des Phosphorsäurederivats des Hexosazons betrachtet.

Im selben Jahr wurden von Young[4]) die Eigenschaften der freien Hexosephosphorsäure (durch Gärung von Glucose, Fructose und Mannose in Gegenwart von Phosphat erhalten) sowie ihrer Salze eingehend beschrieben und die Meinung ausgesprochen, daß die Verbindungen der 3 Hexosen identisch sind und Salze der Säure $C_{16}H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$ sind. Es wurden Silber-, Blei-, Barium- und Calciumsalze hergestellt, deren Zusammensetzung auf die obige Formel paßt.

v. Lebedew[5]) gibt in einer späteren Arbeit weitere Experimente über das Osazon und einige seiner Derivate an. Das umkrystallisierte Osazon schmolz bei 150 bis 152° und entsprach der Formel $C_{24}H_{31}N_6O_7P$, die ein wenig von der früher angegebenen differiert. Er hält es für ein phenylhydrazidophosphorsaures Derivat des Hexosazons und schreibt ihm folgende Zusammensetzung zu:

$$C_6H_8N_2H_2PO_4.C_4H_5(OH)_2.C(NNHC_6H_5)CH.NNHC_6H_5.$$

v. Lebedew gibt ferner an, daß er ein Phosphorsäurehydrazid nicht erhalten konnte, somit konnte freie Phosphor-

[1]) Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 24, 1, 1909.
[2]) Proc. of the Chem. Soc. 23, 65, 1907.
[3]) Diese Zeitschr. 20, 114, 1909.
[4]) Proc. Roy. Soc. B 81, 528, 1909.
[5]) Diese Zeitschr. 28, 213, 1910.

säure während der Bildung des Osazons nicht abgespalten werden. Das müßte aber der Fall sein, wenn der Phosphorsäureester zwei Phosphorsäurereste auf eine Hexosemolekül enthalten würde, der Formel von Young entsprechend. Deshalb kommt er zum Schluß, daß Hexosephosphorsäure nur einen Phosphorsäurerest enthält und erklärt die Tatsache, daß die Analysenresultate der Salze mit der Formel von Young zusammenstimmen dadurch, daß es sich um amorphe Substanzen handelt, die durch ein Phosphor enthaltendes kolloidales Polysaccharid verunreinigt sind (dessen Gegenwart er im Hefepreßsaft annimmt), das durch Bleiacetat gefällt sein soll. Diese Verbindung kann nach v. Lebedew durch Ultrafiltration aus dem Hefepreßsaft entfernt werden und liefert sofort kein Osazon, dagegen ein Phosphor enthaltendes Osazon nach 3stündigem Kochen mit 2,5 normaler Schwefelsäure.

v. Lebedew zweifelt demnach an der Richtigkeit der Gleichungen der Verfasser, die den Kreislauf der Phosphorsäure in der Gärung darstellen und die auf der Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2$ (die für Hexosephosphat angenommen wurde) beruhen.

$$\text{I. } 2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,R'_2HPO_4 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4R'_2)_2 + 2\,H_2O.$$

$$\text{II. } C_6H_{10}O_4(PO_4R'_2)_2 + 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2\,R'_2HPO_4.$$

Abgesehen von der Zusammensetzung von Hexosephosphat wurde die Gleichung I ermittelt aus der Bestimmung: erstens, des Verhältnisses zwischen dem zugesetzten Natriumphosphat und CO_2 und Alkohol, die gebildet wurden als Folge dieses Zusatzes in Gegenwart eines Überschusses an Zucker, zweitens, aus dem Verhältnis von verbrauchtem Zucker und entstandener CO_2, in Gegenwart eines Überschusses an Phosphat.

Die ausgeführten Bestimmungen[1]) setzten außer Zweifel, daß: erstens in der Periode der aktivierten Gärung, in Gegenwart eines Zuckerüberschusses und nach Zusatz von 1 Mol. Phosphat, die Reaktion nach der Gleichung I verläuft und 1 Mol. CO_2 und 1 Mol. Alkohol liefert und daß: zweitens, in Gegenwart eines Überschusses an Phosphat 1 Mol. CO_2 aus 1 Mol. Zucker gebildet wird. Die einzige Gleichung, die mit diesen

[1]) Proc. Roy. Soc. B. 77, 405, 1906; 82, 321, 1910.

experimentellen Daten und mit der Bildung eines Phosphorsäurederivats mit 6 Kohlenstoffatomen in Einklang steht, ist die oben angegebene Gleichung I. Diese Ansicht findet außerdem eine Stütze in den Analysenresultaten der Salze von Young. Die ganze Frage der Zusammensetzung der Hexosephosphorsäureester und ihrer Derivate, die durch Einwirkung von Phenylhydrazin erhalten wurden, wurde durch Young einer erneuten Revision unterworfen, und die erhaltenen Resultate werden in der folgenden Arbeit beschrieben. Es möge hier angeführt werden, daß sie vollständig die früher angenommene Formel der Hexosephosphorsäure bestätigen. Wir sind daher nicht in der Lage, die Stichhaltigkeit der Lebedewschen Argumente gegen die von uns aufgestellte Gleichung anzuerkennen.

Über die Zusammensetzung der durch Hefepreßsaft gebildeten Hexosephosphoräure. II.

Von

W. J. Young.

(Aus dem Biochemical Department of the Lister Institute London.)

(Eingegangen am 22. März 1911.)

Wie in der vorangehenden Arbeit auseinandergesetzt wurde, existieren über die Zusammensetzung der organisch-phosphorsauren Verbindung, die bei der Gärung von Hexosen in Gegenwart von Phosphaten gebildet wird, drei verschiedene Ansichten. Der Verfasser[1]) kam auf Grund der Analysen der Salze sowie ihrer Eigenschaften zu der Ansicht, daß es sich um Hexosephosphorsäure handelt von der Formel: $C_6H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$. v. Lebedew[2]) dagegen vertritt die Meinung, daß die obige Verbindung nur einen Phosphorsäurerest für 1 Mol. der Hexose enthält, weil das daraus entstehende Osazon nur einen Phosphorsäurerest aufweist. Er bemerkt ferner, daß diese Osazonbildung von der Bildung eines Phosphorsäurehydrazids nicht begleitet wird, was der Fall sein müßte, wenn die Hexosephosphorsäure 2 Phosphorsäurereste enthalten würde, von denen einer bei der Osazonbildung abgespalten wird.

Die dritte Ansicht wird durch Iwanoff[3]) vertreten, der angibt, daß es sich um eine Triosephosphorsäure handelt, und der ein Trioseosazon daraus darstellen konnte.

Zur Klärung dieser Fragen wurden weitere Versuche angestellt, die hier nun beschrieben werden sollen.

---

[1]) Proc. Roy. Soc. B 81, 528, 1909.

[2]) Diese Zeitschr. 28, 213, 1910.

[3]) Centralbl. f. Bakt., II. Abt. 24, 1, 1909.

Darstellung der Hexosephosphorsäure.

Die Lösung der Hexosephosphorsäure, die aus dem Bleisalz in der früher angegebenen Weise gewonnen wurde, wurde durch ein Martinsches Filter, das 10% Gelatine enthielt, filtriert, um sie von kolloidalen Stoffen zu trennen, deren Gegenwart nach v. Lebedews Ansicht die früheren Analysenresultate bedingt hat. Die erhaltene Lösung enthielt keine freie H_3PO_4 und wurde durch Alkohol nicht gefällt. Zur Reinigung wurde das Ba-Salz benutzt, das, wenn es auch nicht ausgesprochen krystallinisch ist, doch infolge der größeren Löslichkeit in kaltem wie in warmem Wasser eine gewisse Reinigung gestattet. Die Lösung der Säure wurde sorgfältig mit NaOH (in Gegenwart von Phenolphthalein) neutralisiert und eine genau auf den P-Gehalt berechnete Menge $BaCl_2$-Lösung zugesetzt. Nachdem so viel kaltes Wasser zugesetzt war, um einen etwa sich bildenden Niederschlag aufzulösen, wurde das Ganze auf dem Wasserbade erwärmt. Bald schied sich das Ba-Salz als körnige Masse aus, die abgesaugt und mit heißem Wasser ausgewaschen wurde. Zur Reinigung wurde das Salz in kaltem Wasser gelöst, durch Erwärmen abgeschieden, abgesaugt, mit heißem Wasser gewaschen und über H_2SO_4 im Vakuum getrocknet.

0,5893 g Substanz lieferten 0,4522 g $BaSO_4$,
0,2054 g „ „ 0,0762 g $Mg_2P_2O_7$.

Ber. für $C_6H_{10}O_4(PO_4Ba)_2$:	für $C_6H_{11}O_5PO_4Ba$:	Gef.:
44,92% Ba	34,68	45,16% Ba
10,16% P	7,85	10,33% P

Man ersieht daraus, daß die Analyse die vom Verfasser aufgestellte Formel, die 2 Phosphorsäurereste auf 1 Mol. Hexose enthält, bestätigt.

Die Einwirkung von Phenylhydrazin auf Hexosephosphorsäure.

Es wurden auch Versuche angestellt, um zu sehen, ob das komplexe Osazon, das durch Phenylhydrazin aus Hexosephosphorsäure entsteht und als Phenylhydrazidophosphorsäurederivat des Hexosazons von v. Lebedew interpretiert wurde, wirklich die von ihm angegebene Zusammensetzung

$$C_6H_8N_2H_2PO_4C_4H_5(OH)_2C(N.NHC_6H_5)CH.N.NHC_6H_5$$

besitzt. Diese Verbindung wurde in der von Lebedew angegebenen Weise durch die Einwirkung von Phenylhydrazin auf Hexosephosphorsäure, in Gegenwart von Essigsäure, dargestellt. Es wurde gefunden, daß die beste Ausbeute dann erhalten wurde, wenn 4 oder noch mehr Moleküle Phenylhydrazin auf 1 Mol. Hexosephosphorsäure angewandt wurden, berechnet auf die oben genannte Formel mit 2 H_2PO_4-Resten. Mit einem geringeren Quantum Phenylhydrazin wurde dagegen eine schmierige Masse erhalten. In derselben Weise wurden die Osazone aus den Hexosephosphorsäuren, aus Glucose, Fructose und Mannose erhalten; sie wurden durch Lösen in siedendem Alkohol und allmählichen Zusatz von warmem Chloroform, solange eine kleine Probe abgekühlt die Bildung der Krystalle zeigte, krystallinisch abgeschieden. Gelbe Nadeln. Das Glucosederivat schmolz unter Zersetzung bei 151 bis 152°, das Fructosederivat bei 150 bis 151° und das Mannosederivat bei 152 bis 153°. Mischproben der 3 Verbindungen, hergestellt durch Zusammenreiben in einer Reibschale oder durch Mischung beim Umkrystallieren, schmolzen zwischen 150 und 152°. Die Lebedewschen Präparate schmolzen bei 148 bis 150°. Die Bestimmungen zeigten, daß alle diese Osazone die gleiche Zusammensetzung besitzen, identisch mit der durch v. Lebedew gefundenen.

Glucosederivat.

0,1715 g Substanz lieferten 0,3319 CO_2 und 0,0912 H_2O,
0,2264 g „ „ 31,1 ccm N (747,3; 15,9°),
0,9804 g „ „ 0,2002 $Mg_2P_2O_7$.

Fructosederivat.

0,1983 g Substanz lieferten 26,8 ccm N (746,75; 16°).

Mannosederivat.

0,2522 g Substanz lieferten 0,4899 CO_2 und 0,1182 H_2O,
0,2088 g „ „ 29,9 ccm N (732,9; 19°),
0,2969 g „ „ 0,0618 $Mg_2P_2O_4$.

	Ber. für $C_{24}H_{21}O_7N_6P$:	Gef.: Glucosederivat	Fructose	Mannose
C	52,75	52,78		52,98
H	5,68	5,95		5,24
N	15,38	15,65	15,41	15,78
P	5,68	5,68		5,79

Alle diese Derivate waren im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur über P_2O_5 getrocknet und wurden für die Verbrennung mit CuO gemischt. Der P-Gehalt wurde nach Neumann bestimmt.

Die Osazone der Hexosephosphorsäure aller 3 Hexosen (Glucose, Fructose und Mannose) waren in bezug auf Zusammensetzung und Schmelzpunkt identisch, wodurch die früher vom Verfasser[1]) vertretene Ansicht (Identität der Produkte aus den 3 Hexosen) bestätigt wurde. Dieses wurde schon früher von v. Lebedew für die Schmelzpunkte der Osazone aus den Hexosephosphorsäureestern der Glucose und Fructose gezeigt. Dagegen konnte ein bei 127° schmelzendes Trioseosazon, das nach Iwanoff bei der Einwirkung von Phenylhydrazin auf Hexosephosphorsäure entstehen soll, nicht erhalten werden.

Das Osazon ist in NaOH und KOH leicht löslich, wobei Phenylhydrazin abgespalten wird. Die Menge des so freigemachten Phenylhydrazins wurde durch Lösen des Osazons in kaltem NaOH und nachherige Extraktion im kontinuierlichen Extraktionsapparat bestimmt. Zu dem ätherischen Extrakt wurde HCl zugesetzt und der Äther verdunstet, das salzsaure Phenylhydrazin wurde mit Fehlingscher Lösung erhitzt und der Stickstoff volumetrisch bestimmt. 2 g Osazon liefern Phenylhydrazin, das 80 ccm N bei 22° und 764 mm abgab = 17,55% Phenylhydrazin.

Ber. für 1 Mol. = 19,8% Phenylhydrazin.

Somit wurde durch NaOH nur 1 Mol. Phenylhydrazin abgespalten, wodurch das Osazon als das Phenylhydrazinsalz des Hexosephosphorsäureosazons erkannt wurde.

Die Salze des Hexosephosphorsäureosazons.

Wird das Osazon in kalter NaOH gelöst und nachher mit einem Überschuß von NaOH versetzt, so bildet sich ein gelber Niederschlag. Dieser Niederschlag wurde abgesaugt, gut mit Alkohol und Äther gewaschen und aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Lange, gelbe Nadeln, die sich beim Erhitzen zersetzen, ohne zu schmelzen. Ziemlich leicht löslich in Wasser,

[1]) Young, Proc. Roy. Soc. B 81, 528, 1909.

fast unlöslich in Alkohol. Die Analyse zeigte, daß es sich um ein Na-Salz des Hexosephosphorsäureosazons handelt:

$Na_2PO_4C_4H_5(OH)_3C(N_2H.C_6H_5)CH(N_2HC_6H_5)$.

0,1885 g Substanz lieferten 0,3118 CO_2 und 0,0851 H_2O,
0,1996 g „ „ 19,3 ccm N (772,25; 14,5°),
0,7381 g „ „ 0,1648 $Mg_2P_2O_7$,
0,7953 g „ „ 0,2356 Na_2SO_4.

	Ber. für $C_{18}H_{21}O_7N_4PNa_2$:	Gef.:
C	44,81	45,11
H	4,36	5,05
N	11,61	11,48
P	6,41	6,22
Na	9,54	9,61

Durch Zusatz von $Ba(NO_3)_2$ und 2 Vol. Alkohol (wodurch das Ba-Salz des Osazons der Hexosephosphorsäure gefällt wurde), Abdampfen des Alkohols, Entfernen des überschüssigen Ba durch H_2SO_4, Eindampfen zur Trockne und Erhitzen wurde das Natrium bestimmt. Die Substanz wurde im Vakuum über P_2O_5 getrocknet und zur Verbrennung mit CuO vermengt.

Wird Essigsäure zu dem Na-Salz zugesetzt, so entsteht eine rote Färbung, und die Lösung wird dickflüssig und viscös. Durch Phenylhydrazinzusatz entsteht eine gelbe Substanz, die bei 148° schmilzt und mit dem ursprünglichen Osazon identisch zu sein scheint. Die rot gefärbte Lösung enthält wahrscheinlich die dem Na-Salz entsprechende freie Säure.

Das Anilinsalz des Hexosephosphorsäureosazons wird erhalten, wenn man zu einer kalten wässerigen Lösung des Na-Salzes, die man mit Essigsäure sauer macht, Anilin in essigsaurer Lösung zugibt. Eine gelbe, krystallinische Masse wurde erhalten, die abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und über H_2SO_4 im Vakuum getrocknet wurde. Schmelzpunkt 133 bis 135°. Sie konnte nicht umkrystallisiert werden. Die Analyse stimmte ziemlich gut auf die Formel:

$C_6H_5NH_2.H_2PO_4.C_4H_5(OH)_3.C(N_2HC_6H_5)CH(N_2HC_6H_5)$.

0,1768 g Substanz lieferten 21,7 ccm N (762,1; 22,4°),
0,6577 g „ „ 0,1360 g $Mg_2P_2O_7$.

	Ber. für $C_{24}H_{30}O_7N_5P$:	Gef.:
N	13,18	13,85
P	5,84	5,76

Damit ist endgültig der Beweis erbracht worden, daß die Verbindung, die durch Einwirkung von Phenylhydrazin auf Hexosephosphorsäure entsteht, ein Phenylhydrazinsalz des Hexosephosphorsäureosazons ist, und daß dasselbe nur 1 H_3PO_4-Rest für 1 Mol. Hexose enthält.

Abspaltung von 1 Molekül H_3PO_4 bei der Osazonbildung.

Enthält die Hexosephosphorsäure 2 H_3PO_4-Reste, wie die Analysenresultate dieser Salze zeigen, so muß bei der Osazonbildung 1 Mol. H_3PO_4 abgespalten werden. Es wurde beobachtet, daß das Filtrat nach Darstellung des Osazons stets freie Phosphorsäure enthielt, die durch Magnesiumcitratmischung zur Fällung gebracht werden konnte. Es wurden daher Versuche angestellt, um bei der Osazonbildung das Freiwerden einer äquivalenten Menge Phosphorsäure zu beweisen.

Die Menge der in Lösung angewandten Hexosephosphorsäure wurde aus der Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$ berechnet, aus der Bestimmung des Totalphosphors nach Neumanns Methode. Die Lösung wurde dann mit 6 bis 8 Äquivalentgewichten Phenylhydrazin, in 50%iger Essigsäure gelöst, versetzt und in siedendem Wasser während 20 Minuten erwärmt. Die Lösung wurde in Eiswasser gekühlt, das gebildete Osazon wurde in einem gewogenen Goochtiegel filtriert, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und gewogen. Das Filtrat sowie das Waschwasser wurden zu einem bestimmten Volum aufgefüllt und in 2 Portionen geteilt. In einer Portion wurde die freie Phosphorsäure mit Magnesiumcitratmischung gefällt, der Niederschlag nach mehrstündigem Stehenlassen abfiltriert und mit verdünnter NH_3 und Alkohol gewaschen. Der Niederschlag wurde in verdünnter HNO_3 gelöst und mit Ammoniak wieder gefällt. In dieser Weise wurde das Ammoniummagnesiumsalz vollständig weiß erhalten, das als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung gebracht wurde. Wird zur Osazonlösung Magnesiumcitratmischung zugesetzt, so entsteht ein gelber Niederschlag, wahrscheinlich das Mg-Salz des Osazons, das aber durch NH_3-Überschuß leicht wieder gelöst wird. Der totale Phosphorgehalt wurde in der anderen Portion des Osazonfiltrates nach Neumanns Methode bestimmt.

I. 50 ccm von der Lösung, die 1,7 g Hexosephosphorsäure enthält (Äquivalent für 1,11 g $Mg_2P_2O_7$), lieferten 1,8 g Osazon (theoretische Ausbeute = 2,73 g) = 0,367 g $Mg_2P_2O_7$.

Gebundene H_3PO_4 im Filtrat = 0,364 g $Mg_2P_2O_7$,

Freie H_3PO_4 „ „ = 0,379 g $Mg_2P_2O_7$,

Berechnet aus dem gefundenen Osazon 1 Mol. H_3PO_4 für 1 Mol. Osazon = 0,367 g $Mg_2P_2O_7$.

II. 4,95g in 53 ccm (Äquivalent für 3,232 g $Mg_2P_2O_7$) lieferten 6,6 g Osazon (theoretische Ausbeute 7,9 g) = 1,34 g $Mg_2P_2O_7$.

Freie H_3PO_4 im Filtrat . . . . . = 1,62 g $Mg_2P_2O_7$,

Berechnet aus dem gefundenen Osazon = 1,34 g $Mg_2P_2O_7$.

In beiden Fällen ist die Menge der freigewordenen H_3PO_4 etwas höher, als für 1 Mol. H_3PO_4 aus 1 Mol. Osazon berechnet wurde. Dies mag auf die geringe Löslichkeit des Osazons in Wasser zurückgeführt werden, so daß die gefundene Osazonmenge nicht ganz die wahre Menge vorstellt. Es ist aber auch möglich, daß Hexosephosphorsäure durch Essigsäure in geringem Grade hydrolysiert wird.

In weiteren Versuchen wurde die durch Erhitzen des Hexosephosphorsäureesters mit Essigsäure freigemachte H_3PO_4 (Dauer des Erhitzens wie oben) bestimmt. Diese H_3PO_4-Menge ist höher als die im Versuch erhaltene Menge, aus folgenden Gründen: Ein Teil der Essigsäure ist an Phenylhydrazin gebunden und weiter wird die Hexosephosphorsäure rasch in das Osazon umgewandelt, aus dem, wie ein Versuch zeigt, Essigsäure praktisch keine Phosphorsäure abspaltet. 1 g Osazon wurde mit 25 ccm Wasser, das 4 ccm einer 50%igen Essigsäure enthielt, erhitzt und nur eine Spur von Niederschlag mit Magnesiumcitratgemisch erhalten.

III. 1,86 g Hexosephosphorsäure, in 25 ccm Lösung enthalten (Äquivalent für 1,215 g $Mg_2P_2O_7$), wurden mit 6 g Phenylhydrazin in 4 ccm 50%iger Essigsäure erhitzt.

Erhalten 2,01 g Osazon (Theorie 2,999 g).

Freie H_3PO_4 im Filtrat . . . = 0,657 g $Mg_2P_2O_7$,

Gebundene H_3PO_4 „ „ . . . = 0,139 g $Mg_2P_2O_7$,

H_3PO_4 berechnet aus dem gefundenen Osazon . . . . . = 0,409 g $Mg_2P_2O_7$,

H_3PO_4 durch Essigsäure freigemacht ohne Phenylhydrazinzusatz . . . = 0,295 g $Mg_2P_2O_7$.

Somit ist die durch Phenylhydrazin freigemachte H_3PO_4 wenigstens $0{,}657 - 0{,}295 = 0{,}362$ g $Mg_2P_2O_7$.

IV. 1,86 g Hexosephosphorsäure (= 1,215 g $Mg_2P_2O_7$) wurden mit 6 g Phenylhydrazin, in 5 ccm Alkohol gelöst (ohne Essigsäurezusatz), erhitzt.

Erhalten 2,4 g Osazon (Theorie verlangt 2,99 g).

Freie H_3PO_4 im Filtrat . . . = 0,660 g $Mg_2P_2O_7$,
Gebundene H_3PO_4 „ „ . . . = 0,077 g $Mg_2P_2O_7$,
Berechnet aus dem gefundenen Osazon = 0,488 g $Mg_2P_2O_7$.
Kontrolle: Hexosephosphorsäure dieselbe Zeit mit 5 ccm Alkohol erhitzt = 0,056 g $Mg_2P_2O_7$.

Somit wurden $0{,}660 - 0{,}056 = 0{,}604$ g $Mg_2P_2O_7$ bei der Osazonbildung abgespalten.

Die Mengen abgespaltener H_3PO_4 stimmen leidlich gut mit der Hypothese, daß 1 Mol. H_3PO_4 abgespalten wird, dagegen sind sie mit der Ansicht v. Lebedews, der keine Abspaltung von H_3PO_4 annimmt, unvereinbar.

Hydrazone der Hexosephosphorsäure.

Ohne Schilderung seiner Versuche gibt v. Lebedew an, daß Hexosephosphorsäure mit Phenylhydrazin in der Kälte momentan ein weißes Hydrazon liefert. In analoger Weise erhielt er eine krystallisierte Verbindung mit p-Bromphenylhydrazin, für die er die Formel $C_{12}H_{15}N_2BrPO_8$ (Hexosephosphorsäure-p-bromhydrazon) annimmt; seine Analysenzahlen stimmen auf die obige Formel nicht. Vor einiger Zeit erhielt Verfasser eine p-Bromphenylhydrazinverbindung, die er für p-Bromphenylhydrazinphosphat hielt, was auch mit der Bromanalyse ziemlich gut stimmt. Im Laufe der Versuche, die die Darstellung krystallisierter Salze aus Hexosephosphorsäure mit organischen Basen zum Ziele hatten, wurde vermutet, daß die oben genannten Verbindungen Salze dieser Säure mit Phenylhydrazin und p-Bromphenylhydrazin sein möchten. Weitere Versuche zeigten aber bald, daß es sich hier um komplexe Hydrazone der Hexosephosphorsäure handelt.

Das Phenylhydrazinsalz des Hexosediphosphorsäurephenylhydrazons.

Die weiße Verbindung von Lebedew wird am besten durch Zusatz von genau 3 Mol. der Base zu 1 Mol. Hexosephosphorsäure dargestellt. Ist die Hexosephosphorsäure ziemlich kon-

zentriert (2 n), so bildet sich die Verbindung im amorphen Zustand in einigen Minuten. Ist die Lösung verdünnt (normal oder weniger wie normal), so tritt keine Abscheidung auf. Leicht wird es erhalten, wenn man zu einer annähernd normalen Hexosephosphorsäurelösung genau 3 Mol. Phenylhydrazin zusetzt, das sich in der Säure auflöst. Nach einigen Minuten wird 1 Vol. Alkohol zugesetzt und das Ganze in Kältemischung gekühlt. Die weiße Verbindung scheidet sich in Nadelbüscheln ab. Die Krystalle werden abgesaugt, mit eiskaltem, verdünntem Alkohol (2:3), dann mit absolutem Alkohol und trockenem Äther gewaschen. Die Verbindung ist sehr unbeständig und färbt sich bald gelb an der Luft; selbst wenn sie trocken ist, färbt sie sich gelb und schließlich orange. Die Krystalle wurden deswegen gleich im Exsiccator ins Dunkle gestellt und die letzten Ätherspuren mit der Pumpe entfernt. Zum Schlusse wurden die Krystalle in der Dunkelheit im Vakuum über P_2O_5 getrocknet, und in dieser Weise wurden sie nur mit einem Stich ins Gelbe erhalten. Alle Versuche, die Substanz ohne Zersetzung umzukrystallisieren, waren erfolglos. Schmelzpunkt bei 115 bis 117°, nimmt aber dunkle Farbe schon früher an. Die, wie oben angegeben, getrocknete Substanz ist nur wenig löslich in kaltem Wasser, löst sich aber leicht in kalter verdünnter NaOH, unter Abspaltung von Phenylhydrazin, das mit Äther extrahiert werden kann. Das gesamte Phenylhydrazin ist nicht in gleicher Weise gebunden, weil es nicht vollständig mit kalter NaOH in Freiheit gesetzt wird. Nach dem Ausäthern der alkalischen Lösung, Verjagen des Äthers und Neutralisation des Rückstandes mit Essigsäure, konnte mit Bleiacetat ein schwach-gelbes Bleisalz erhalten werden, das einer Säure entspricht, die mindestens 5,9% Stickstoff enthält.

Dieses Phenylhydrazinderivat liefert bei der Analyse folgende Zahlen:

0,1157 g Substanz lieferten 0,1901 g CO_2 und 0,0606 g H_2O,
0,1264 „ „ „ 14,2 ccm N (777,25; 15,8°),
0,2120 „ „ „ 0,0739 g $Mg_2P_2O_7$.

	Ber. für $C_{24}H_{36}O_{11}N_6P_2$:	Gef.:
C	44,58	44,81
H	5,57	5,86
N	13,00	13,36
P	9,60	9,70

Somit stellt die Verbindung ein Phenylhydrazon der Hexosephosphorsäure, das zwei Phosphorsäurereste enthält, die ihrerseits mit 1 Mol. Phenylhydrazin salzartig gebunden sind:

$$(C_6H_5N_2H_3 . H_3PO_4)_2C_6H_7(OH)_3N_2HC_6H_5.$$

Ein einfaches Hydrazon der Hexosephosphorsäure (mit 1 Mol. H_3PO_4) wie auch ein Phenylhydrazinsalz des Hydrazons konnten hier nicht vorliegen, wie die Berechnung ihrer Zusammensetzung zeigt:

	Hydrazon $= C_{12}H_{19}O_8N_2P$	Phenylhydrazinsalz des Hydrazons $C_{18}H_{27}O_8N_4P$
C	41,14	47,16
H	5,43	5,89
N	8,00	12,23
P	8,86	6,77

Das p-Bromphenylhydrazinsalz des p-Bromphenylhydrazons der Hexosediphosphorsäure.

Diese Verbindung wurde erhalten, wenn man zu einer Hexosephosphorsäurelösung (1 Mol.) in der Kälte 3 Mol. p-Bromphenylhydrazin, in Alkohol gelöst, zusetzte. Das Volum des angewandten Alkohols war dasselbe wie das der Hexosephosphorsäurelösung. Nach einiger Zeit scheiden sich farblose Nadeln ab, die abgesaugt wurden und mit kaltem, verdünntem Alkohol, absolutem Alkohol und mit trockenem Äther gewaschen wurden. Beim Trocknen müssen dieselben Vorsichtsmaßregeln beobachtet werden wie bei der Phenylhydrazinverbindung. Die Substanz war nach dem Trocknen über P_2O_5 im Vakuum nur schwach gelb gefärbt. Alle Versuche, die Substanz umzukrystallisieren, schlugen fehl. Schmelzpunkt bei 127 bis 128°, was mit der Angabe von v. Lebedew übereinstimmt. Die N-Analyse differiert etwas von der von v. Lebedew erhaltenen Zahl, sowie auch von der Zahl, berechnet für das Hydrazon mit 1 Mol. H_3PO_4. Die Substanz ist ganz der vorangehenden Verbindung analog gebaut:

$$(C_6H_4BrN_2H_3 . H_3PO_4)_2C_6H_7(OH)_3N_2HC_6H_4Br.$$

0,3357 g Substanz lieferten 27,4 ccm N (775,4; 19,2°),
0,5024 g „ „ 0,1249 ccm $Mg_2P_2O_7$,
0,1813 g „ „ 0,1156 ccm AgBr.

	Ber. für:		Gef.:
	$C_{24}H_{33}O_{11}N_6P_2Br_3$	$C_{12}H_{18}O_8N_2PBr$ (v. L.)	
N	9,51	6,53	9,52
P	7,02	7,23	6,92
Br	27,18	18,65	27,13

Brom wurde nach der Methode von H. Pringsheim[1]) bestimmt.

Die Substanz löst sich in verd. NaOH unter Abspaltung von p-Bromphenylhydrazin, das in der früher angegebenen Weise ausgeäthert werden konnte.

Werden diese Hydrazone mit Wasser erhitzt, so spaltet sich 1 Mol. H_3PO_4 ab, unter Bildung des entsprechenden Osazons, wie folgende Versuche zeigen:

I. Zu 0,5 g von dem Phenylhydrazinsalz, in Wasser gelöst wurde eine geringe Menge Phenylhydrazin, in Essigsäure gelöst, zugesetzt und das Ganze in kochendem Wasserbad erwärmt. Phenylhydrazin wurde aus dem Grunde zugesetzt, weil das Hydrazon nicht genügend Phenylhydrazin enthält, um das bereits beschriebene Osazon zu bilden. Wird die Mischung im Eiswasser abgekühlt, so scheiden sich bald gelbe Krystalle aus, die abgesaugt und mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen wurden. Die Substanz schmolz, aus Alkohol-Chloroformmischung umkrystallisiert, bei 150°, zeigte also denselben Schmelzpunkt wie das Osazon. Die freie H_3PO_4-Menge, im Filtrat und Waschwasser bestimmt, war äquivalent 0,088 g $Mg_2P_2O_7$. Für die Abspaltung eines Phosphorsäuremoleküls aus 0,5 g Hydrazon berechnen sich 0,086 g $Mg_2P_2O_7$.

II. 0,5 g p-Bromphenylhydrazinsalz lieferten, nach Erhitzen mit einer geringen Menge p-Bromphenylhydrazin (in Alkoho gelöst), ein gelbes Osazon, das abfiltriert und mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen wurde. Der Schmelzpunkt dieser Verbindung wurde, ohne die Substanz umzukrystallisieren, bei 162 bis 163° gefunden (v. Lebedew 165°). Das Filtrat und Waschwasser enthielten eine freie H_3PO_4-Menge, die 0,0615 g $Mg_2P_2O_7$ äquivalent war. Ber. 0,063 g.

Diese Versuche werfen einiges Licht auf die Konstitution der Hexosephosphorsäure. In früheren Mitteilungen meinte der Verf., daß diese Verbindung keine freie Carbonylgruppe auf-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 4265, 1908.

weist, weil die Reduktion der Fehlingschen Lösung in der Kälte nur sehr langsam war. Die Bildung der Hydrazone beweist aber, daß dies unrichtig ist. Die Tatsache, daß Hexosephosphorsäure ein komplexes Osazon, unter Abspaltung von 1 Mol. H_3PO_4, bildet, ist mit Iwanoffs Ansicht, daß es sich um einen Phosphorsäureester einer Triose handelt, unvereinbar. Die Versuche sprechen dafür, daß 1 Mol. H_3PO_4 an das der Carbonylgruppe benachbarte C-Atom gebunden ist. Diese Bedingungen würden erfüllt sein, wenn Hexosephosphorsäure eine der beiden Konstitutionsformeln besitzt.

I. $CH_2PO_4H_2$ | CO | $C_4H_3O_3(PO_4H_2)$ oder II. CHO | $CH.PO_4H_2$ | $C_4H_3O_3(PO_4H_2)$

Es konnte vorläufig nicht entschieden werden, welche von den beiden Formeln zutreffend ist; die Tatsache, daß Hexosephosphorsäure bei der Hydrolyse Fructose liefert, weist aber auf die I. Formel hin.

Zusammenfassung.

I. Die Hexosephosphorsäure, die sich durch Wirkung der Zymase auf Glucose, Fructose oder Mannose in Gegenwart von Phosphaten bildet, enthält 2 Phosphorsäurereste auf 1 Mol. Hexose und besitzt die schon früher vom Verf. angegebene Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$.

II. Wird Hexosephosphorsäure mit Phenylhydrazin erhitzt, so spaltet sich ein Molekül Phosphorsäure ab, und es entsteht ein Phenylhydrazinsalz des Hexosephosphorsäureosazons, das die von v. Lebedew angegebene Formel besitzt.

III. Hexosephosphorsäure liefert mit Phenylhydrazin in der Kälte eine unbeständige Verbindung, die das Salz der Base mit dem Diphosphorsäureester eines Hexosehydrazons darstellt.

IV. Mit etwas Phenylhydrazin erhitzt, verwandelt sich das Salz in das oben erwähnte Osazon mit gleichzeitiger Abspaltung von 1 Mol. Phosphorsäure.

V. Ein analoges Hydrazinderivat wurde auch mit p-Bromphenylhydrazin isoliert.

VI. Ein H_3PO_4-Rest in Hexosephosphorsäure scheint an ein der Carbonylgruppe benachbartes C-Atom gebunden zu sein.

Reis als Nahrungsmittel.

Untersuchungen über den N- und P_2O_5-Stoffwechsel bei Ernährung mit Reis und anderer hauptsächlich vegetabilischer Nahrung.[1])

Von

Hans Aron und Felix Hocson.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Philippine Medical School, Manila, P. I.)

(Eingegangen am 25. März 1911.)

Unter den vegetabilischen Nahrungsmitteln des Menschen dürfte der Reis seiner Verbreitung nach mit die erste Stelle beanspruchen können. Leben doch allein in Asien schätzungsweise 400 Millionen Menschen — Inder, Chinesen, Japaner und Malaien — von Reis. Die niederen Volksschichten, Kulis, Arbeiter und Bauern, genießen neben dem Reis oft nur eine ganz geringe Menge anderer vegetabilischer und animalischer Nahrungsmittel, da ihr karger Verdienst keine reichhaltigere Kost gestattet.

Vielfach ist schon erwogen worden, ob eine hauptsächlich aus Reis bestehende Nahrung für den Menschen in jeder Beziehung ausreichend und dem Körper zuträglich ist. Eine weitergehende Bedeutung gewinnt diese Frage noch durch die enge Beziehung, die zwischen der Ernährung mit bestimmten Reissorten und gewissen polyneuritischen, gewöhnlich als Beri-Beri bezeichneten Krankheitserscheinungen besteht.

---

[1]) Einige der hier kurz angeführten Versuche sind schon in anderem Zusammenhang von uns beschrieben worden (Phil. J. Science 5, 98 ff.). Eine ausführlichere Veröffentlichung der übrigen Versuche wird später an gleicher Stelle erfolgen.

Die Unterschiede in der Zusammensetzung der verschiedenen Reisvarietäten, deren es vom botanischen Standpunkte eine beträchtliche Zahl gibt, sind nicht sehr groß, so daß wir vom ernährungsphysiologischen Standpunkt gemeinhin von „Reis" sprechen können. Dagegen wird die chemische Zusammensetzung des Reiskornes durch die Art seiner Bearbeitung nicht unerheblich verändert. Zum Genuß für den Menschen muß der Reis unter allen Umständen enthülst werden.

Dieser enthülste Reis (im Tagalischen Pinawa genannt) sieht bräunlich oder rötlich aus, ist eßbar und wird auch genossen. Meist aber wird das enthülste Reiskorn (Endosperm) von seinem Pericarp („Silberhäutchen") und den darunter liegenden subcorticalen Schichten durch einen Mahlprozeß befreit, dem ev. noch ein Polierprozeß folgt. In den Handmühlen der Eingeborenen wird dieser Mahlprozeß nur recht unvollkommen ausgeführt und deshalb nur ein Teil des Pericarps und eine geringe Menge der subcorticalen Schichten entfernt. Mit den modernen Maschinenmühlen kann der Reis dagegen viel intensiver gemahlen werden, und der gewonnene „polierte" Reis sieht rein weiß aus. Mit der in den Mühlen abgemahlenen Reiskleie werden dem Reiskorn gewisse Bestandteile entzogen, und die chemische Zusammensetzung des Reises ändert sich in charakteristischer Weise mit der Intensität des Mahl- resp. Mahl- und Polierprozesses. Je größer die Menge der abgemahlenen Reiskleie ist (in den Maschinenmühlen wird ca. $^1/_6$ bis $^1/_5$ des Reiskorns in Form von Kleie abgeschliffen), desto mehr Cellulose, Ätherextrakt (Fett) und Asche verliert der Reis nicht nur absolut, sondern auch relativ. Unter den Aschebestandteilen ist der Quantität und wahrscheinlich auch der physiologischen Bedeutung nach am wichtigsten die Phosphorsäure, die hauptsächlich in Form von Phytin in der Reiskleie enthalten ist.

Ein Reis ist um so phosphorärmer, je intensiver er gemahlen resp. gemahlen und poliert worden ist, und der P_2O_5-Gehalt einer Reisprobe kann geradezu als Maßstab der Intensität des Mahlprozesses dienen. Wir haben in größerem Maßstabe Versuche in einer Reismühle mit 2 verschiedenen Reissorten („Tagalog"- und „Ilocano"-Reis) durchgeführt (Tab. I Nr. 6, 15, 20, 24, 26, 27), die diese Ansicht vollkommen bestätigen. Ferner haben wir im Laufe der letzten 2 Jahre 28 verschiedene Reissorten auf ihren P_2O_5-Gehalt untersucht. Die folgende Tabelle I zeigt deutlich, daß der P_2O_5-Gehalt in engen Grenzen durch den Grad der Bearbeitung bestimmt wird: je mehr Kleie abgemahlen ist, desto P_2O_5-ärmer ist der Reis. Der N-Gehalt des Reises variiert viel weniger als der P_2O_5-Gehalt.

Tabelle I.

Nr.	Bezeichnung	Aussehen	P_2O_5 %	N %	H_2O %
1	Liverpool	porzellanartig	0,15	1,07	11,67
2	Valenciana	schneeweiß	0,20		
3	Stoffw.-Vers. Mai 1910	rein weiß Manila, Handelsmarke „I blanco“	0,28	1,29	11,75
4	Stoffw.-Vers. Jan. 1910	„ „ „ „	0,28	1,32	
5	„Laguna“ Ia blanco	„ „ „ „	0,31		
6	„Ilocano“Sup. bl.	„ „ „ „	0,32	1,20	
7	Stoffw.-Vers. 4ff.	„ „ „ „	0,32	1,06	
8	Culion, Dez. 1909	„ „ „ „	0,32		
9	Manila, käuflich	„ „ „ „	0,33		
10	Stoffw.-Vers. Jan. 1910	weiß	0,33	1,48	
11	Macań Maschinen-weiß	„	0,34		
12	Stoffw.-Vers. 15	ziemlich weiß, leicht bräunlicher Ton	0,37	1,23	
13	„Bombay“	bräunlich, Pericarp usw. unvollständig entfernt	0,41	1,25	11,97
14	Cape Engaño	leicht bräunlich, Pericarp usw. teilweise entfernt	0,43		
15	Tagalog „D“	bräunlich, Pericarp usw. teilweise entfernt	0,45	1,42	
16	Calcutta	bräunlich, Pericarp usw. nur zum geringen Teil entfernt	0,45	1,24	11,63
17	Culion Jan. 1910	bräunlich, Pericarp unvollständig entfernt	0,46		
18	Macań, in Eingeborenen-Handmühle gemahlen	bräunlich, Pericarp nur zum geringen Teil entfernt	0,46		
19	Siam: „Asylum“	do.	0,52		
20	Tagalog „C“	do. Pericarp bräunlich rot!	0,53	1,43	
21	„Laguna“, oberflächl. gemahlen	bräunlich, Pericarp nur zum geringen Teil entfernt	0,56		
22	Stoffw.-Vers. Febr. 1910	do.	0,57	1,19	
23	Tonkin	nur oberflächlich gemahlen, Pericarp größtenteils erhalten	0,58		
24	Ilocano „III“	do.	0,58		
25	Culion Okt. 1910	do.	0,60	1,19	
26	„Tagaloc“ Pinawa	nur enthülst und gereinigt	0,73	1,54	
27	„Ilocano“ Pinawa	„ „ „ „	0,75	1,27	
28	Stoffw.-Vers. 3 Pinawa	„ „ „ „	0,77	1,29	

Der gleiche Reis wird zwar beim Mahlen etwas N-ärmer (vgl. Nr. 6, 24, 27 und 15, 20, 26), aber der N-Gehalt einzelner Reissorten ist auch verschieden. Deshalb gestattet der N-Gehalt eines Reises keinen Rückschluß auf den Mahlprozeß. Für praktische Zwecke können wir nach dem P_2O_5-Gehalt 3 Stadien der Bearbeitung unterscheiden:

1. Enthülster Reis, P_2O_5-Gehalt 0,7 bis 0,8%.
2. Untermahlener Reis (undermilled), P_2O_5-Gehalt 0,4 bis 0,6%.
3. Übermahlener Reis (overmilled), P_2O_5-Gehalt 0,15 bis 0,4%.

Als Nahrungsmittel betrachtet, zeigt der Reis seiner chemischen Zusammensetzung nach folgende Charakteristica:

1. Reis ist verhältnismäßig arm an Eiweiß.
2. Reis ist äußerst reich an Kohlenhydraten, besonders Stärke.
3. Weißer Reis ist asche- und besonders P_2O_5-arm.

Einige Zahlenbeispiele mögen das illustrieren:

100 g Reis liefern ungefähr 350 Calorien und enthalten 7 bis 8 g Eiweiß. Mehr als 600 g, höchstens 700 g Reis — die mit 2100 resp. 2400 Calorien den täglichen Energiebedarf schon annähernd decken — werden im Durchschnitt selten genossen werden. Mit dieser Reismenge werden dann 45 bis 55 g Eiweiß aufgenommen. Die gleiche Menge weißen Reises enthält 1,5 bis 2,0 g P_2O_5. Oft werden aber diese Quantitäten noch nicht einmal erreicht, besonders wenn andere, kohlenhydrat- oder fettreiche Nahrungsmittel als Beikost genossen werden.

Man findet ferner noch die Annahme verbreitet, daß eine Reiskost sehr voluminös sein müsse. Die meisten Forscher (Voit, Rubner u. a.) berechnen die bei einer Mahlzeit aufgenommenen Speisemengen unter der Annahme, der Reis essende Eingeborene koche den Reis so, wie ihn der Europäer zu genießen pflegt. Dann würden die Quantitäten allerdings enorm sein. Schon Scheube[1]) hat darauf hingewiesen, daß diese Annahme irrig ist. Auf Grund eigener Beobachtung wissen wir, daß Japaner, Chinesen und Malaien durchweg den Reis mit ganz wenig Wasser kochen; das Reiskorn wird zwar teigig weich, bleibt aber trocken. Anläßlich eines Versuches haben wir 10 Tage lang täglich 2mal den von Eingeborenen gekochten Reis vor und nach dem Kochen gewogen und sehr

[1]) B. Scheube, Arch. f. Hygiene 1, 352/83.

übereinstimmend gefunden, daß 100 g roher Reis ungefähr 250 g gekochten Reis liefern. Eine Mahlzeit von 300 g rohem Reis — und mehr wird auf einmal selten verzehrt — wiegt also ca. 750 g. Das ist für eine vegetabilische Kost, die immer voluminöser als eine animalische ist, gar nicht viel. Dazu kommt, daß wenigstens der Malaie, wir glauben, auch der Chinese und Japaner, sehr selten zum Essen trinkt — meist nachher, und auch dann wenig. Wählen wir zum Vergleich einen Deutschen, der oft 1 l Flüssigkeit zum Essen trinkt, so ist dessen Mahlzeit sicher voluminöser als die des Reis essenden Malaien.

Die Betrachtungen über die Zusammensetzung des Reises ließen es als wichtig erscheinen, den N- und P_2O_5-Stoffwechsel bei Reiskost und ähnlich zusammengesetzten mehr oder minder N- und P_2O_5-armen Kostmassen zu untersuchen. Die Grundlage aller Rationen, die wir in unseren Versuchen gaben, bildete Reis; dazu wurden als Beikost wechselnde Mengen pflanzlicher und tierischer Nahrungsmittel (Brot, Früchte, Gemüse, Zucker, Fisch, Speck, Schmalz) gereicht. Das in einem großen Teil der Versuche gegebene Brot war aus feinem Weizenmehl gebacken und in seinem N-, P_2O_5- und Kohlenhydrat-Gehalt weißem Reis recht ähnlich.

Die meisten Versuche wurden an Strafgefangenen im Hospital des Staatsgefängnisses Bilibid angestellt. Zu einigen Versuchen erboten sich zwei Medizinstudierende H. Velarde und H. Feliciano, denen wir für ihre Hilfeleistung unseren Dank aussprechen.

Über die Versuchsanordnung sei kurz bemerkt: In Durchschnittsproben aller verabreichten Nahrungsmittel wurde der N- und P_2O_5-Gehalt bestimmt. Trockensubstanz, Fett usw. nur dann, wenn zur Berechnung des Brennwertes der Nahrung erforderlich. Der Calorienwert der Nahrung wurde aus ihrem Fett-, Eiweiß- und Kohlenhydratgehalt nach bekanntem Schema berechnet.

Der Harn wurde in Tagesproben von 8 a. m. bis 8 a. m. in luftdicht verschließbaren, mit ca. 5 g Thymol und 10 ccm verdünnter Schwefelsäure beschickten Flaschen gesammelt, der mit Carmin periodenweise abgegrenzte Kot in breite, mit aufgeschliffener Glasplatte verschließbare Glaszylinder entleert und sofort mit Formalin konserviert. In aliquoten Teilen des auf ein bekanntes Volumen aufgefüllten Harns und in Proben des getrockneten Kotes wurde N, P_2O_5 und Trockensubstanz bestimmt. Die Versuchspersonen waren gesunde Leute; die Gefangenen hatten meist einige Zeit vorher kleine chirurgische Operationen überstanden.

Ta

Nr.	Autor	Versuchsperson	Körpergewicht kg	Tägliche Nahrung	Dauer des Versuchs Tage	Calorien täglich	Calorien pro kg
1	Rubner	23jähriger Mann	72	638 g Reis 24 g Fleischextrakt 82 g Knochenmark	2	2970	40
2	Thomas	Verfasser	75,9	500 g Reismehl 320 g Milchzucker 100 g Stärke 30 g Rohrzucker 2 Citronen Kochsalz	2	3615	46
3	Kumagawa	Verfasser, 27 Jahre alt, Japaner	48	450 g Reis 80 g Miso 250 g Kohlrüben 10 g Shoyu 1 l Tee 800 ccm Bier	5	2030	42
4	Derselbe	„	48	600 g Reis 100 g Miso 300 g Kohlrüben 10 g Shoyu 595 ccm Bier 585 ccm Tee	9	2590	54

Besonderer Wert wurde darauf gelegt, nur Leute zu den Versuchen zu nehmen, die nicht an Verdauungsstörungen litten, eine geregelte Kotentleerung hatten und deren Faeces sich bei der mikroskopischen Untersuchung frei von Eingeweideparasiten resp. deren Eiern erwiesen hatten. Während der Versuche waren die Gefangenen — natürlich jeder für sich — in einem schattigen und luftigen Zimmer des Gefängnishospitals eingesperrt. Sie leisteten praktisch keine körperliche Arbeit. Nur so ließ sich eine genaue Kontrolle ermöglichen und zu gleicher Zeit die Schweißsekretion auf ein Minimum reduzieren. Die beiden Studenten wohnten ganz nahe beim Laboratorium und haben während der Versuche geringe Laboratoriumsarbeit getan. Da demnach die tägliche Arbeitsleistung unserer Versuchspersonen nur eine recht beschränkte war, sind die aufgenommenen Nahrungs- und Calorienmengen verhältnismäßig gering. Sicherlich sind Versuche bei schwerer körperlicher Arbeit und ent-

belle II.

Stickstoff									
Einnahmen				Ausgaben					
In Reis g	In der Beikost g	Summe g	N pro kg Körpergewicht g	Im Urin g	Im Urin % der Einnahme	Im Kot g	Im Kot % der Einnahme	N-Bilanz g	Bemerkungen
8,9	1,55	10,45	0,14	11,59	> 100	2,13	20,4	− 3,27	
5,04	—	5,04	0,07	4,52	89,9	1,64	32,6	− 1,12	Breiiger Stuhl!
4,46	2,61	7,07	0,15	7,06	99,9	1,66	23,5	− 1,65	
6,00	2,76	8,76	0,19	6,07	69,3	2,03	23,2	+ 0,66	

sprechend größerer Zufuhr einer ähnlich zusammengesetzten Nahrung wie der in unseren Versuchen gegebenen erwünscht und notwendig. Diese würden aber in den Tropen durch die dann unumgänglich notwendige Bestimmung des N-Gehaltes des Schweißes so kompliziert werden, daß wir glaubten, vorerst davon abstehen zu dürfen.

In der Literatur haben wir 4 einwandfreie Versuche[1–3]) gefunden, in denen bei einer fast ausschließlich aus Reis bestehenden Kost der N-Stoffwechsel untersucht worden ist. Wir haben diese in der vorangehenden Tab. II zusammengestellt. Über den P_2O_5-Stoffwechsel bei einer solchen Kost konnten wir keine Untersuchungen finden. Unsere eigenen Versuche folgen dann in Tabelle III, die die Art und Menge der aufgenommenen

[1]) M. Rubner, Zeitschr. f. Biol. 15, 115/202.
[2]) K. Thomas, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1909, 219/302.
[3]) M. Kumagawa, Virchows Archiv 116, 370/431.

Ta-

Versuchs-Nr.	Versuchsperson	Körpergewicht kg	Tägliche Nahrungsaufnahme							Versuchsdauer Tage	Calorien	
			Reis g	Brot g	Fisch g	Zucker g	Speck g	Kaffee ccm	Diverse		pro die	pro kg Körpergewicht
1	Student Y.	53,7	400	—	—	45	60	150	100 g Bananen 200 g Reiskuchen	3	2360	44
2	Student F.	54,0	400	—	—	40	60	175	150 g Bananen 200 g Reiskuchen	3	2400	44
3	Gefangener C.	49,0	400 [1]	—	—	50	50	300	100 g Zwiebeln 20 g Schmalz	4	2200	44
4	Gefangener C.	48,6	400 [2]	—	—	50	50	300	100 g Zwiebeln 20 g Schmalz	4	2200	45
5	Gefangener B.	64,0	300	400	—	100	75	200	—	4	2600	41
6	Gefangener B.	64,0	300	400	—	90	75	400	6 g Phytin	4	2600	41
7	Gefangener B.	64,0	300	400	—	90	75	300	12 g Eiereiweiß	4	2600	41
8	Student F.	54,0	400	—	120	40	—	175	150 g Bananen 200 g Reiskuchen	4	2100	39
9	Gefangener D.	43,5	200	150	75	150	—	500	—	6	1650	38
10	Gefangener A.	52,5	300	300	40	50	—	300	—	4	1880	37
11	Gefangener A.	52,5	250	250	40	100	—	300	75 g Reiskleie	4	1880	37
12	Gefangener E.	54,0	250	200	100	100	—	500	—	3	1750	31
13	Gefangener E.	54,0	250	200	100	100	—	500	—	3	1750	31
14	Gefangener G.	45,9	200	200	60	50	—	500	—	4	1350	30
15	Gefangener H.	53,0	250	200	60	75	—	500	—	4	1600	30

Nahrung, deren N- und P_2O_5-Gehalt, die in den Ausscheidungen gefundenen N- und P_2O_5-Mengen, die prozentische Verteilung von N und P_2O_5 auf Harn und Kot und schließlich die N- und P_2O_5-Bilanz wiedergibt.

Stickstoff-Stoffwechsel.

In den Versuchen mit fast reiner Reisnahrung konnten weder Rubner noch Thomas trotz verhältnismäßig großer Calorienzufuhr N-Gleichgewicht erzielen; allerdings dienten ihnen als Versuchspersonen Europäer; bei unseren Malaien (Versuche 1 bis 4) war ebenfalls die N-Ausscheidung größer als die Zufuhr; jedoch ist hier die Gesamt-N-Aufnahme gering. Auch Kumagawa gelang es nur in einem seiner Versuche mit

[1]) „Roter" Reis, nur enthülst.

[2]) „Weißer" Reis, intensiv gemahlen.

[3]) Kotabgrenzung mißglückt; nur Harnwerte.

belle III.

Stickstoff									Phosphorsäure						
Einnahme				Ausgabe				Bilanz des N	Einnahme		Ausgabe				Bilanz der P_2O_5
				Im Urin		Im Kot					Im Urin		Im Kot		
Animal. N g	Vegetabil. N g	Gesamt-N g	N pro kg Körpergewicht g	N g	% der Einnahme	N g	% der Einnahme	g	Gesamt-P_2O_5 g	P_2O_5 pro kg Körpergewicht g	P_2O_5 g	% der Einnahme	P_2O_5 g	% der Einnahme	g
0,49	5,49	5,98	0,11	5,87	98,2	1,77	29,1	−1,66	—	—	—	—	—	—	—
0,49	5,60	6,09	0,11	4,86	90,1	2,06	33,3	−0,83	—	—	—	—	—	—	—
0,38	5,45	5,83	0,12	4,26	73,1	3,11	—	−1,68	3,22	0,066	1,03	32,0	2,03	63,1	+0,16
0,38	4,53	4,91	0,10	4,26	86,7	2,33	—	−1,54	1,42	0,029	1,04	73,2	0,83	58,4	−0,45
0,31	9,26	9,57	0,15	10,85	>100	3,39	35,4	−4,67	1,50	0,023	1,74	>100	0,73	48,7	−0,97
0,25	9,16	9,41	0,15	8,26	87,7	3,23	34,3	−2,08	4,91	0,077	1,56	31,7	1,85	37,7	+1,50
1,95	9,11	11,06	0,17	9,66	87,3	3,38	30,6	−1,98	1,88	0,029	1,57	83,5	0,61	32,4	−0,30
4,26	5,66	9,92	0,18	8,20	82,6	2,15	21,7	−0,43	—	—	—	—	—	—	—
2,84	4,76	7,60	0,18	5,90	77,5	1,64	21,6	+0,06	1,28	0,033	0,80	62,5	0,49	38,0	−0,01
2,52	8,47	10,99	0,21	7,97	72,5	2,64	24	+0,38	1,57	0,032	1,14	72,6	0,52	33,7	+0,01
2,52	8,97	11,49	0,23	7,18	62,5	3,74	—	+0,57	5,46	0,104	1,38	25,3	3,46	63,4	+0,62
4,37	5,90	10,27	0,19	8,96	47,4	2,03	19,0	−0,72	1,77	0,033	1,23	57,6	0,76	42,9	−0,22
4,37	5,90	10,27	0,19	8,73	85,1	2,27	22,1	−0,73	1,77	0,033	1,11	57,6	0,73	41,2	−0,10
2,62	5,28	7,90	0,17	6,72	85,1	1,98	25,1	−0,80	1,45	0,032	0,95	65,5	0,58	40,0	−0,08
2,62	5,90	8,52	0,16	6,87	80,6	—[3])	—	—	1,63	0,031	1,21	74,2	—	—	—

wesentlich größeren als den von uns gereichten Nahrungsmengen bei einer Gesamt-N-Zufuhr von 8 g N (0,19 g N pro Kilogramm) und einer Calorienzufuhr von 2590 Calorien (54 Calorien pro Kilogramm) N-Gleichgewicht zu erzielen. Es darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß er neben dem Reis eine nicht unbedeutende Menge anderer Vegetabilien verzehrt hat. In noch höherem Maße gilt das für die Versuche Tanigutis[1]), Moris und Kellners[2]) sowie Yukawas[3]), die wir deshalb in unserer Tabelle gar nicht aufführen.

Es scheint demnach schwierig zu sein, im Stoffwechselversuch mit einer fast reinen Reiskost so viel N zuzuführen, als vom Körper erfordert wird. Vielleicht ist es einer schwere

[1]) K. Taniguti, Arb. Kais. jap. militär-med. Lehranst. 1, 85/90, nach Malys Jahresber. 22, 467/8.

[2]) O. Kellner und V. Mori, Zeitschr. f. Biol. 25, 102/22.

[3]) Yukawa, Arch. f. Verdauungskrankh. 15, Heft 4 u. 5.

Arbeit leistenden Versuchsperson, deren Calorienbedarf größer ist, leichter, die zum N-Gleichgewicht nötigen N-Mengen mit reiner Reisnahrung aufzunehmen, als Versuchspersonen, die wie die unseren fast keine Arbeit verrichteten.

Stoffwechselversuche mit Nahrungsgemischen aus Reis und Fisch, resp. Reis und Fleisch und anderen Vegetabilien finden sich in der Literatur in nicht geringer Zahl, so daß es zu weit führen würde, diese hier alle zu diskutieren. Wir beschränken uns deshalb auf unsere eigenen Versuche (5 bis 15). In diesen haben wir sowohl wechselnde N- wie wechselnde Calorienmengen gegeben, in der Absicht, den Einfluß partieller Unterernährung zu studieren. Zum leichteren Vergleich der Versuche miteinander haben wir die folgende Tabelle IV zusammengestellt, die die Calorien- und die N-Zufuhr sowie die N-Bilanz auf 50 kg Körpergewicht reduziert wiedergibt.

Tabelle IV.
Reduziert auf 50 kg Körpergewicht.

Versuch Nr.	Calorien	N-Zufuhr g	N-Bilanz g	Nahrung
4	2250	5,0	−1,6	Reis, Speck usw.
2	2200	5,5	−0,8	
1	2250	5,5	−1,7	
3	2200	6,0	−1,6	
5	2050	7,5	−3,5	Reis, Brot, Speck usw.
6	2050	7,5	−1,6	
7	2050	8,5	−1,5	
14	1500	8,5	−0,9	Reis, Brot, Fisch usw.
8	1950	9,0	−0,4	
9	1900	9,0	+0,1	
12	1550	9,5	−0,6	
13	1550	9,5	−0,6	
10	1850	10,5	+0,4	
11	1850	11,5	+0,5	

Bei einer Calorienzufuhr von weniger als 1800 Calorien (Versuche 12, 13, 14) ist es selbst bei verhältnismäßig hoher N-Zufuhr (9,5 g) nicht gelungen, N-Gleichgewicht zu erzielen. Gaben wir aber 1800 Calorien oder mehr, so waren 9,0 g N pro 50 kg (Versuche 9, 10, 11) ausreichend; bei geringerer N-Zufuhr überstieg aber trotz einer Calorienzufuhr von 2200 Calorien die Ausfuhr an Stickstoff die Aufnahme. Allerdings beträgt selbst bei einer Zufuhr von 5 bis 6 g N das Defizit

weniger als 2 g (Versuche 1 bis 4), so daß wohl 8,0 g N in manchen Fällen ausreichen dürften.

Dieser Wert 8,0 g N pro 50 kg oder 0,16 g N pro Kilogramm Körpergewicht liegt keineswegs an der untersten Grenze des möglichen N-Gleichgewichts. Verschiedene Autoren haben mit noch geringerer N-Zufuhr in der Nahrung zeitweise N-Gleichgewicht erreicht. Von größter Bedeutung für die Frage, ob die in einer Nahrung gegebene Eiweißmenge ausreichend ist oder nicht, ist die Resorbierbarkeit. Denn das unresorbiert mit dem Kot wieder ausgeschiedene Eiweiß ist für die Ernährung und den Körper völlig wertlos.

Betrachten wir von diesem Gesichtspunkte jetzt einmal etwas eingehender die N-Ausnutzung! Bei reiner Reisnahrung werden ca. 30% des aufgenommenen N (Versuche 1 und 2) — von der zu Versuch 4 dienenden Person sogar 47% — im Kot wieder ausgeschieden. Der in den äußeren Schichten des Reises enthaltene Stickstoff, wie er mit dem nur enthülsten Reis (Versuch 3) oder in der zugelegten Reiskleie (Versuch 11) aufgenommen wird, ist schlecht ausnutzbar und wird nur zum geringen Teil (ca. 25%) überhaupt resorbiert. Der mit dem N-Gehalt des „weißen" Reises verglichen etwas höhere N-Gehalt des „roten" Reises ist daher physiologisch fast ohne Bedeutung. Rubner fand ca. 75% des Reisstickstoffs resorbierbar, Mori sogar 78,3%; Werte, die den unsern näher liegen, geben Thomas und Yukawa, die 67,4% resp. 66,1% des Reisstickstoffs ausnutzbar fanden.

Da der Stickstoff des Kotes nicht nur aus unresorbiertem Nahrungsstickstoff besteht, sondern wir hier auch den Stickstoff der Sekrete des Verdauungstraktes wiederfinden, muß die Menge des unausgenutzten Stickstoffs, in Prozenten der N-Aufnahme ausgedrückt, um so höher sein, je niedriger die N-Aufnahme ist. Auf diese Weise mag sich erklären, daß Thomas und wir (bei sehr geringen N-Gaben) eine prozentual schlechtere Ausnutzung fanden als die anderen Autoren.

Die Ausnutzung des im Weizenbrot + Reis aufgenommenen N ist annähernd die gleiche wie die im weißen Reis, wenn wir nur die Versuche 1 und 2 berücksichtigen. Ziehen wir allerdings auch Versuch 4 in Betracht, so stellt sich die Ausnutzung des Reis-N nicht so günstig. Recht interessant sind

nun die Versuche mit gemischter Kost. Die folgende Tabelle V zeigt deutlich, daß die N-Ausnutzung um so besser ist, je geringer die Menge des vegetabilischen Stickstoffs in der Nahrung ist. Der N-Gehalt der Faeces ist fast direkt der Menge des vegetabilischen N der Nahrung proportional und wird von der Menge des animalischen N kaum beeinflußt. Deshalb ist die N-Menge des Kotes in Prozenten des vegetabilischen N der Nahrung ausgedrückt fast konstant (ca. 35%).

Tabelle V.

Versuch Nr.	In der Nahrung			Menge des Kotstickstoffs	N-Ausnutzung	Kotstickstoff in % des aufgenommenen vegetabil. N
	Animal. N	Vegetab. N	Gesamt-N			
	g	g	g	g	%	%
5	0,31	9,26	9,57	3,39	64,6	36,5
6	0,25	9,16	9,41	3,23	65,7	35,2
7	1,95	9,11	11,06	3,38	69,4	37,1
10	2,52	8,47	10,99	2,64	76,0	31,2
13	4,37	5,90	10,27	2,27	77,9	38,5
12	4,37	5,90	10,27	2,03	81,0	36,0
8	4,26	5,66	9,92	2,15	78,3	37,9
14	2,62	5,28	7,90	1,98	74,9	37,5
9	2,84	4,76	7,60	1,64	78,4	34,4

Wir sehen also, daß es für die Beurteilung des physiologischen Wertes des Eiweißgehaltes einer Nahrung von ausschlaggebender Bedeutung ist, festzustellen, wieviel Eiweiß animalischer, wieviel vegetabilischer Herkunft ist. Da zirka ein Drittel des Eiweißes aus Reis und Weizen (aus anderen Vegetabilien noch mehr) unresorbiert im Darm wieder ausgeschieden wird, so müssen wir diese Menge als physiologisch wertlos in Abzug bringen. Die Untersuchungen von Michaud[1]) und Thomas[2]) deuten in Harmonie mit älteren unter Leitung von Zuntz ausgeführten Versuchen[3]) darauf hin, daß außerdem die „biologische Wertigkeit" der verschiedenen Eiweißarten keineswegs gleich ist. Wenn auch Thomas gerade dem Reiseiweiß eine verhältnismäßig hohe biologische Wertigkeit (88%) zuschreibt (nur ein Versuch von 2tägiger Dauer!), so steht doch das Reis-

[1]) Michaud, Zeitschr. f. physiol. Chem. 59, 405/91.

[2]) Thomas, l. c.

[3]) Potthast, Beiträge zur Kenntnis des Eiweißumsatzes im tierischen Organismus. Inaug.-Dissert. Münster 1887.

eiweiß in seiner biologischen Wertigkeit sicherlich hinter den animalischen Eiweißarten zurück. Es ist bedauerlich, daß wir über die chemische Zusammensetzung gerade des Reiseiweißes so wenig wissen,[1]) während über die so vieler unwichtiger pflanzlicher Eiweißkörper detaillierte Untersuchungen vorliegen.

Wir möchten an dieser Stelle schließlich noch darauf hinweisen, daß man unserer Ansicht nach die „Ausnutzung" oder „Resorbierbarkeit" des Stickstoffs nur ermitteln kann, wenn man den N-Gehalt des Kotes bestimmt. Die resorbierte N-Menge ist die aufgenommene Menge N, vermindert um die im Kot ausgeschiedene N-Menge. Würde man die im Harn ausgeschiedene N-Menge als Maß des resorbierten N ansehen, so kann man sehr leicht zu Fehlschlüssen gelangen. Die im Harn ausgeschiedene N-Menge entspricht ja der resorbierten N-Menge nur für den Fall, daß die Versuchsperson sich im N-Gleichgewicht befindet.

Phosphorstoffwechsel.

Zur besseren Übersicht geben wir wieder in der folgenden Tabelle VI die aufgenommenen P_2O_5-Mengen und die P_2O_5-Bilanz, beide auf 50 kg Körpergewicht reduziert. Wenn sich auch ein P_2O_5-Minimum ebensowenig wird aufstellen lassen wie ein N-Minimum, so geht doch aus unseren Versuchen mit Sicherheit hervor, daß eine Zufuhr von 1,65 g P_2O_5 oder weniger pro 50 kg (0,033 g P_2O_5 pro Kilogramm) den Bedarf des Körpers an P_2O_5 nicht deckt. Von den meisten Autoren werden beträchtlich größere P_2O_5-Mengen in der Nahrung als notwendig erachtet.[2])

Schon einleitend ist auf die physiologische Bedeutung der Phosphorarmut des polierten (weißen) Reises hingewiesen worden. Eine hauptsächlich aus weißem Reis oder weißem Reis, Brot, Speck und anderen phosphorarmen Nahrungsmitteln bestehende Kost vermag den P_2O_5-Bedarf eines Menschen nicht zu decken (Versuche 4, 5, 7). Ein Vergleich der Versuche 3 und 4 lehrt ferner, daß bei Ernährung mit hauptsächlich weißem Reis der Körper Phosphor verliert, während mit einer gleichen Menge unpolierten Reises eine den Bedarf sogar übersteigende Menge P_2O_5 aufgenommen wird.

---

[1]) Suzuki, Yoshimura und Fuji, Journ. Coll. Agric. Tokyo 1, 77/88. — O. Rosenheim und S. Kajura, Journ. of Physiol. 36, Proc. 54/55.

[2]) Tigerstedt, Handb. d. Physiol. 1, 530. — Elnströhm, Skand. Arch. f. Physiol. 14, 91. — Renvall, ebenda 16, 94/138. — Oeri, Zeitschr. f. klin. Med. 67, 288/306.

Tabelle VI.
Reduziert auf 50 kg Körpergewicht.

Versuch Nr.	P_2O_5-Zufuhr g	P_2O_5-Bilanz %
5	1,15	− 0,8
4	1,45	− 0,45
7	1,45	− 0,3
10	1,60	+ 0,01
14	1,60	− 0,1
9	1,65	− 0,01
12	1,65	− 0,2
13	1,65	− 0,1
3	3,30	+ 0,16
6	3,85	+ 1,2
11	5,20	+ 0,6

Die Verteilung des Phosphors auf Harn und Kot ist deshalb nicht von solcher Bedeutung wie die Verteilung des Stickstoffs, weil der im Kot ausgeschiedene Phosphor nicht als unresorbiert angesehen werden darf. Es ist vielmehr sicher, daß in den oberen Darmabschnitten resorbierter Phosphor in den unteren Darmabschnitten wieder ausgeschieden wird. Immerhin ist es beachtenswert, daß bei erhöhter P_2O_5-Zufuhr (in Form von Phytin oder Reiskleie) der P_2O_5-Überschuß beinahe gänzlich durch den Kot wieder ausgeschieden wird.

Über den Wert und die Bedeutung des Reises als menschliches Nahrungsmittel gewinnen wir auf Grund unserer Versuche und Erfahrungen folgendes Urteil:

Eine reine Reisnahrung deckt den Eiweißbedarf des Menschen nur ungenügend. Es müssen daher dem Reis pflanzliche oder am besten tierische eiweißreiche Nahrungsmittel zugelegt werden. Eine gemischte Reis-Fischkost (oder Reis-Fleischkost) ist eine hygienisch einwandfreie Nahrung, wenn der Reis nicht durch übermäßige Mahl- resp. Polierprozesse zu phosphorarm gemacht worden ist. Vom ökonomischen Standpunkt ist der Reis für weite Landstriche Asiens das billigste Nahrungsmittel. Man kann 3000 Calorien im Reis in vielen Gebieten für 12 Pfennige kaufen, während man in Deutschland für eine gleiche Nahrungsmenge in Form von Kartoffeln 16 Pfennige oder von Roggen 14 Pfennige zahlen muß. Als Eiweißquelle ist der Reis dagegen teurer. 100 g Reiseiweiß haben einen Geldwert von mindestens 15 Pfennigen (und nur ca. 70 g

kommen hiervon dem Körper zugute), während man die gleiche Eiweißmenge in Form gewisser Bohnenarten (z. B. Phaseolus radiatus u. a.) oder in manchen Küstengegenden auch in Form von Fisch für beinahe die Hälfte dieser Summe kaufen kann. Vom ernährungsphysiologischen und hygienischen Standpunkte empfiehlt sich für die Bevölkerung Reis erzeugender Distrikte rationell bearbeiteter, d. h. nicht übermäßig gemahlener Reis als Hauptnahrungsmittel, daneben muß jedoch für eine ausreichende, besonders eiweißreiche Beikost Sorge getragen werden.

Auf Grund unserer Versuche sehen wir die folgenden N- resp. Eiweißmengen in der Nahrung für einen 50 kg wiegenden Mann als die niedrigsten hygienisch zulässigen an:

Vegetab. Kost: Reis + Vegetabilien: 12 g N = 75 g Eiweiß.

Gemischte Kost: Reis + Fisch (oder Fleisch) 10 g N = 65 g Eiweiß, von denen mindestens ein Drittel animalischer Herkunft sein sollte.

Es sei uns zum Schlusse erlaubt, diesen Ausführungen noch einige allgemeinere Betrachtungen über die Verwendbarkeit des Reises als Nahrungsmittel anzuschließen: Reis ist — wie wenige Vegetabilien — an sich fast geschmacklos und kann fast jedem anderen Nahrungsmittel beigemischt werden. Sowohl mit Fleisch oder Fettarten (salzig) als mit Früchten usw. (süß) gekocht, ist er schmackhaft. Das enthülste und weiter bearbeitete Reiskorn ist für längere Zeit haltbar und erfordert nur einen kurzen Kochprozeß, um genießbar zu werden. Da Reis nur ca. 10 bis 15% Wasser und „Nahrungsschlacken" enthält, ist er ein verhältnismäßig konzentriertes Nahrungsmittel. Schließlich ist Reis leicht überall unterzubringen und wäre somit eigentlich ein fast ideales Nahrungsmittel für Expeditionen, Feldzüge usw., kurz überall da, wo es darauf ankommt, haltbare, leicht transportable und schnell zubereitbare Nahrungsmittel mit sich zu führen. Dem Mehl ist der Reis darin sicher überlegen, und vor dem Brot hat Reis den Vorzug größerer Haltbarkeit und geringeren Wassergehaltes. Es wäre zu erwägen, ob man dem Reis nicht in der Truppenverproviantierung eine größere Rolle einräumen sollte, in erster Linie für die Verpflegung weißer Truppen, die in Reis erzeugenden Ländern stehen.

Studien in der Chlorophyllgruppe. IX.

Von

L. Marchlewski.

Über das Phylloporphyrin.

Von

L. Marchlewski und J. Robel.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität zu Krakau.)

(Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften zu Krakau.)

(Eingegangen am 27. März 1911.)

Mit 1 Figur im Text und 1 Tafel.

Im Jahre 1894 beschrieb der eine von uns mit E. Schunck[1]) ein rotgefärbtes Abbauprodukt des Chlorophylls, das sie Phylloporphyrin nannten. Zu seiner Darstellung wurde vorzugsweise Phyllotaonin, ein Umwandlungsprodukt des Alkachlorophylls benutzt. Dasselbe wurde in geschlossenem Rohr mit alkoholischem Kali während einiger Stunden auf 190° erhitzt. Beim Öffnen der erhaltenen Röhren konnte kein Druck wahrgenommen werden. Der braunrot gefärbte Inhalt wurde in einen Scheidetrichter gebracht, mit Wasser verdünnt, mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther färbte sich prachtvoll purpurrot und gab beim Verdampfen eine braune Substanz, in der dunkelrotviolette Krystalle eingebettet waren. Die Masse wurde mit Alkohol ausgekocht, von der braunen Substanz filtriert und das Filtrat mit einer alkoholischen Lösung von Zinkacetat versetzt. Nach einigem Stehen dieser Lösung bildet sich eine krystallinische, rot gefärbte Abscheidung, die zinkhaltig ist. Sie wird in siedendem Alkohol

[1]) Liebigs Annalen 284, 81, 1894.

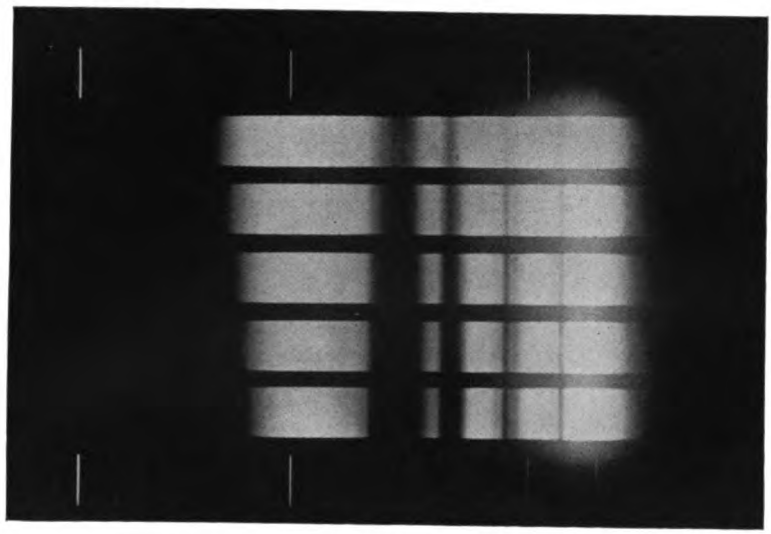


Fig. 1

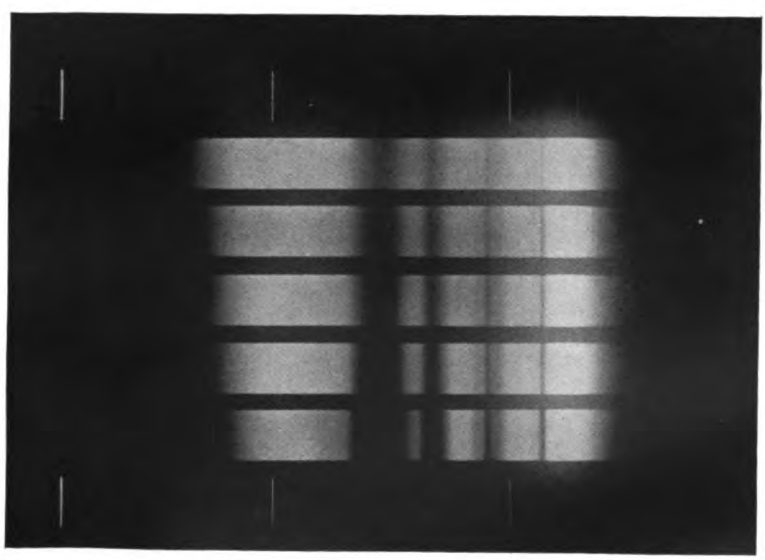


Fig. 2.

gelöst, mit einigen Tropfen konz. Salzsäure versetzt, die Lösung in viel Wasser gegossen und mit Äther extrahiert. Letzterer färbt sich prachtvoll carmoisinrot und gibt nach dem Waschen mit Wasser und Verdampfen dunkelrotviolette Krystalle, die schließlich aus Alkohol umkrystallisiert werden.

Die Eigenschaften des Phylloporphyrins wurden wie folgt beschrieben: Es stellt eine prachtvoll dunkelrotviolett gefärbte, krystallisierte Substanz vor. Unter dem Mikroskop erscheinen die Krystalle als kurze, regelmäßige, dunkelrote, glasglänzende Prismen. Dünnere Kryställchen erscheinen im durchfallenden Lichte rotviolett. Es löst sich nur schwer in Alkohol, Äther, leichter in Chloroform, schwieriger in Schwefelkohlenstoff mit prachtvoll roter Farbe. Die Lösungen fluorescieren rot und bekommen durch Zusatz von Spuren einer Säure einen bläulichen Stich. In Mineralsäuren und Eisessig löst es sich sehr leicht mit rotvioletter Farbe, wobei salzartige, ziemlich beständige Verbindungen entstehen. Diese Lösungen geben beim Schütteln mit Äther an letzteren nichts ab, auch nicht in dem Falle, wenn man die Lösungen stark mit Wasser verdünnt. Neben den basischen Eigenschaften besitzt das Phylloporphyrin auch, wenn auch weniger ausgesprochen, saure Eigenschaften. In wässerigen Alkalien lösen sich die Krystalle des Phylloporphyrins so gut wie gar nicht. Gießt man jedoch die alkoholische Lösung in wässerige Natronlauge, so bekommt man eine braune Suspension des Natriumsalzes, das durch Äther der Flüssigkeit nicht entzogen werden kann. Sobald man jedoch das Alkali durch Essigsäure bindet, geht die freie Substanz in Äther über.

Eine damals ausgeführte Analyse ergab das Resultat: 75,98% C, 7,10% H und 11,02% N, das zur Formel $C_{32}H_{34}N_4O_2$ führte.

Das Phylloporphyrin wurde dann später von dem einen von uns häufig untersucht, und zwar infolge seiner überraschenden Ähnlichkeit mit den Porphyrinen des Blutfarbstoffs. Auch wurde versucht, seine Darstellungsweise zu vereinfachen, denn die oben beschriebene, die das reine Phyllotaonin bzw. Allophyllotaonin zum Ausgangspunkt macht, ist sehr kostspielig und zeitraubend. Marchlewski und Piasecki[1]) machten in

[1]) Bull. de l'Acad. d. Sc. de Cracovie 1908, 127.

dieser Richtung den nächsten Schritt. Sie verfuhren wie folgt: Eine alkoholische Chlorophyllrohlösung wird mit einer gesättigten wässerigen Bariumhydroxydlösung versetzt, die gebildete Fällung abfiltriert und mit Alkohol gewaschen. Nach dem Trocknen wird das Produkt pulverisiert, in Alkohol suspendiert und konzentrierte Schwefelsäure tropfenweise zugesetzt. Das Bariumsalz wird hierdurch zerlegt, und die Hauptmasse des Farbstoffs wird von dem Alkohol aufgenommen. Der Säureüberschuß darf hierbei nur minimal sein. Von dem gebildeten Bariumsulfat wird abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird nun in 10%igem alkoholischem Kali gelöst und die Lösung mehrere Stunden bei 200° im Autoklaven erhitzt. Nach dem Erkalten wird das doppelte Volumen Alkohol zugesetzt, zum Sieden erhitzt, filtriert, das Filtrat mit dem 4fachen Volumen Wasser versetzt, mit Essigsäure angesäuert und schließlich mit Äther im Scheidetrichter extrahiert. Der Farbstoff wird nahezu vollständig vom Äther aufgenommen, so daß die wässerige Schicht nur schwach braun gefärbt erscheint. Die ätherische Lösung wird alsdann mit 5%iger Salzsäure behandelt, wobei ein großer Teil des Farbstoffes in die Säure übergeht. Letzterer wird aus der Lösung durch Zusatz von Natriumacetat in Form eines rotbraunen Schlammes abgeschieden. Das Ganze wird von neuem mit Äther behandelt, wobei der größte Teil gelöst wird und nun die ätherische Lösung von neuem mit Salzsäure extrahiert, aber mit bedeutend schwächerer, nämlich 1%iger.

Aus der salzsauren Lösung wurde der Farbstoff von neuem durch Natriumacetatzusatz gefällt und nach dem Trocknen aus Alkohol 2mal umkrystallisiert. Die Analyse des Produktes ergab 74,11% C, 7,39% H und 10,45% N. Marchlewski und Piasecki sagen aber ausdrücklich, daß es noch nicht sicher ist, ob dieses Produkt ganz frei von Verunreinigungen war und ob es identisch mit dem aus Phyllotaonin erhaltenen Porphyrin ist.[1])

Wir haben diese oben angeführte Methode von Marchlewski und Piasecki einem näheren Studium unterworfen und ge-

[1]) Wörtlich l. c.: Whether it is quite free from any impurities and identical with phylloporphyrine obtained from phyllotaonine remains to be seen.

funden, daß, obwohl in optischer Beziehung das erhaltene Produkt als rein zu bezeichnen ist, es doch eine geringe Menge einer bräunlichen Substanz enthielt, deren Anwesenheit das Analysenresultat, besonders den C-Wert beeinflußt. Die Methode gestaltet sich jetzt wie folgt:

Ein starkes Chlorophyllrohextrakt wird mit festem Kalihydrat versetzt, und zwar in solcher Menge, daß die Lösung eine alkalische Reaktion erhält, ohne einen Niederschlag abzusetzen. Sodann wird das Chlorophyll durch Zusatz einer gesättigten methylalkoholischen $Ba(OH)_2$-Lösung gefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und noch feucht in einen großen Porzellanmörser gebracht, mit 96%igem Alkohol versetzt, und zwar in solchen Mengen, daß eine dünne Suspension entsteht und tropfenweise mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, bis zum Erscheinen einer schwach sauren Reaktion. In diesem Momente erhält das Gemisch eine gallertartige Konsistenz. Das Ganze wird jetzt in einen Kolben gespritzt und während 10 bis 15 Minuten auf 40° erwärmt. Der etwaige Säureüberschuß wird endlich durch Bariumcarbonatzusatz abgestumpft und filtriert. Der noch stark gefärbte Rückstand wird 2mal mit warmem Alkohol ausgezogen und die erhaltenen Filtrate werden mit dem ersten vereinigt. Nun alkalisiert man durch Zusatz von 10%igem alkoholischem KOH und destilliert den Alkohol ab. Den Rückstand löst man in 10%igem alkoholischem KOH und erwärmt während 3 Stunden in einem mit Silber bekleideten Autoklaven auf 200°.

Der Autoklaveninhalt wird nun mit Wasser verdünnt, mit Essigsäure angesäuert, wobei ein brauner Niederschlag entsteht, und mit Äther extrahiert, wie weiter unten beschrieben ist. Das obige Verfahren hat den Nachteil, daß man mit unbekannten Quantitäten arbeitet; bei späteren Versuchen haben wir uns daher zur Anwendung eines wenigstens halbwegs rein dargestellten Phyllotaonins entschlossen. Als Ausgangsmaterial diente das oben beschriebene Bariumsalz, das nach dem Filtrieren auf dem Wasserbade getrocknet wurde. Das zerriebene Pulver wurde sodann auf Phyllotaonin nach dem Verfahren von Koźniewski und Marchlewski[1]) verarbeitet. 5 g des gewonnenen, nicht

[1]) Bull. de l'Acad. d. Sc. de Cracovie 1908, 247.

krystallisierten Phyllotaonins löste man in 250 ccm 10%igem alkoholischem KOH und erhitzte im Autoklaven 3 Stunden lang bei 190 bis 200°. Nach dem Erkalten wird mit Wasser verdünnt, mit Essigsäure angesäuert und mit Äther extrahiert, wobei ca. 1200 ccm zur Anwendung kommen. Nun wurde die ätherische Lösung mit 1%iger Salzsäure erschöpft, sodann mit 5%iger und 10%iger HCl. Die beiden letzthin genannten Säuren extrahierten bedeutend weniger. Im Äther bleibt ein Farbstoff von rotbrauner Farbe zurück.

Die 1%ige Fraktion wird nun mit so viel Wasser versetzt, daß in bezug auf HCl eine ¾%ige Lösung entsteht. Nun wird mit Äther extrahiert, wobei das Phylloporphyrin in den Äther übergeht, während braune Verunreinigungen in der Salzsäure zurückbleiben. Die ätherische Lösung wird mit frischer ¾%iger Salzsäure 2mal durchgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, eingedampft und der Rückstand aus Alkohol umkrystallisiert. Die Eigenschaften und Zusammensetzung des so erhaltenen Produktes stimmen mit den Angaben von Marchlewski und Schunck durchaus überein.

Hervorzuheben ist, daß, wenn die oben angegebene Temperatur überschritten wird, bereits bei 210°, oder wenn das angewandte Alkali stärker ist, z. B. 20%ig, die Reaktion anders verläuft. Die 1%ige Fraktion hat dann nicht den charakteristischen bläulichen Stich des Phylloporphyrins, sondern ist rein rot, bzw. besitzt auch einen gelblichen Stich.

Analysen des bei 110° getrockneten Phylloporphyrins:

1. 0,1018 g gaben v = 10,4, t = 20,5°, b = 744, entsprechend N: 11,35%.

2. 0,1134 g gaben v = 11,8, t = 22°, b = 741, entsprechend N: 11,43%.

3. 0,1048 g gaben v = 11,0, t = 22°, b = 734, entsprechend N: 11,35%.

4. 0,1007 g gaben v = 10,45, t = 20°, b = 734,5 mm, entsprechend N: 11,35%,

5. 0,1052 g gaben 0,2911 g CO_2, 0,0699 g H_2O, entsprechend C: 75,47%, H: 7,38%.

In Äther ist das Produkt nicht besonders leicht löslich, obwohl das Lösungsmittel stark tingiert wird. Die gesättigte Lösung, die, wie es sich zeigte, im Liter 0,26 g enthielt, ergab

die folgenden Extinktionskoeffizienten, nach einer Methode bestimmt, die demnächst an dieser Stelle ausführlich beschrieben werden soll. Kurz möge erwähnt werden, daß der benutzte Apparat eine Kombination eines Monochromators mit dem Königs-Martensschen Spektrophotometer bildete. Als Lichtquelle diente eine Handregulierbogenlampe; nur bei der Bestimmung des letzten Wertes der Tabelle wurde das Hg-Licht angewandt.

Schichtendicke 10 mm.

λ	$\frac{a_1}{2}$	$\frac{a_2}{2}$	E
665	40,7	40,1	0,0092
660	40,6	40,0	0,0092
655	41,0	39,3	0,0262
650	41,6	38,8	0,0431
645	42,0	38,4	0,0554
640	43,0	37,8	0,0800
635	45,1	36,0	0,1403
630	49,6	33,4	0,2509
625	64,6	18,4	0,8015
620	71,8	11,1	1,1904
615	58,5	19,4	0,6660
610	50,1	24,4	0,4210
605	45,0	27,7	0,2798
600	46,6	26,7	0,3228
595	49,1	24,5	0,4037
589,3	49,5	24,8	0,4038
585	58,6	23,9	0,5678
580	69,5	15,4	0,9872
575	77,0	9,5	1,4130
570	79,2	7,4	1,6060
565	79,0	8,5	1,5369
560	63,2	19,0	0,7596
555	56,0	24,3	0,5163
550	52,9	28,0	0,3956
545	54,1	28,4	0,4074
540	55,9	26,4	0,4735
535	67,8	17,3	0,8958
530	81,8	5,7	1,8475
525	nicht bestimmbar		—
520	81,3	5,5	1,8317
515	67,0	15,0	0,9441
510	70,2	12,3	1,1051
505	82,2	4,7	1,9484
500	nicht bestimmbar		—

λ	$\frac{a_1}{2}$	$\frac{a_2}{2}$	E
495	nicht bestimmbar		—
490	,,	,,	—
485	,,	,,	—
480	80,6	6,5	1,7244
475	70,8	13,1	1,0913
470	66,1	15,9	0,8988
436	76,0	8,9	1,4085

Die Extinktionskoeffizienten für die Wellenlängen 525, 500, 495, 490, 485 konnten für die gewählte Schicht nicht bestimmt werden, wegen der zu starken Absorption. In der Absorptionskurve (Fig. 1) wurden die entsprechenden Koeffizienten willkürlich den nächstliegenden, experimentell bestimmten gleich angenommen und diese Willkür durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

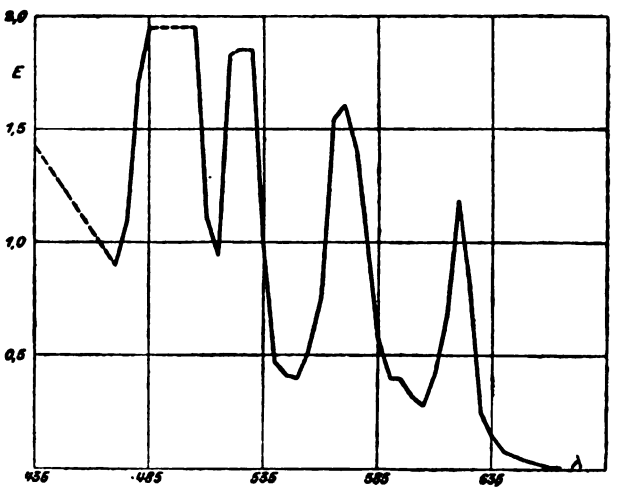


Fig. 1.

Die außerordentlich komplizierten Absorptionsverhältnisse ätherischer Phylloporphyrinlösungen wurden bereits von Schunck und Marchlewski, sowie von dem letzteren beschrieben. Es wurden nur solche Konzentrationen berücksichtigt, bei denen die meisten Bänder gut zum Ausdruck kommen, was besonders für Vergleichszwecke mit Blutporphyrinen notwendig war. Den Vergleich der Absorptionen verschiedener Schichtendicken haben

wir jetzt ausgeführt und geben die erhaltenen Resultate tabellarisch zusammengesetzt wieder (s. Tab. S. 212 u. 213).

Der Vergleich dieser Werte mit früher publizierten lehrt, daß letztere mit den jetzt für die 10 mm-Schicht erhaltenen übereinstimmen. Es wurde nämlich damals erhalten:

Band I: λ 625 bis 620
„ II: λ 616 „ 610
„ III: λ 600 „ 595
„ IV: λ 581 „ 573
„ V: λ 570 „ 566
„ VI: λ 536 „ 520
„ VII: λ 506 „ 478

Wie ersichtlich, fehlt hier ein Band λ 560 bis 557,3, das bei der jetzt untersuchten Lösung allerdings auch nur äußerst schwach erscheint. Es ist sehr gut möglich, daß früher infolge Anwendung einer etwas schwächeren Konzentration dieses Band tatsächlich nicht mehr bemerkt werden konnte; auch ist unsere jetzige Apparatur unvergleichlich besser als die damalige.

Weiterhin muß auf 2 Bänder aufmerksam gemacht werden, die früher infolge des Studiums nur schwächerer Konzentrationen nicht bemerkt wurden. Das erste, äußerst schwache, kaum wahrnehmbare liegt bei λ 650,5 bis 647,0 und tritt nur hervor, wenn die Schichtendicke resp. Konzentration so stark ist, daß alle übrigen Bänder zu einer „Totalabsorption" zusammenschmelzen. Das zweite liegt bei λ 544,3 bis 541,5, ist ebenfalls sehr schwach und nur in dickeren Schichtendicken wahrnehmbar.

Bei der systematischen Untersuchung ätherischer Phylloporphyrinlösungen von ansteigender Schichtendicke findet man also insgesamt 10 Bänder, abgesehen von 2 Bändern im Ultraviolett. Es war daher von allergrößter Bedeutung nachzuforschen, ob die Blutporphyrine auf Grund der jetzt neu aufgefundenen Bänder sich doch optisch vom Phylloporphyrin unterscheiden. Es hat sich dabei gezeigt, daß die drei neuen Bänder sich auch beim Mesoporphyrin wiederfinden, und zwar in genau derselben Lage, ähnlich wie auch die anderen Bänder in bezug auf Lage sich kaum von den Phylloporphyrinbändern unterscheiden, was auch die beiden

Gesättigte Phylloporphyrin-

Schichtendicke	1 mm	5 mm	10 mm	20 mm
Ia	—	—	—	—
I	622,8—621,0	623,3—620,0	624,0—619,5	624,5—617,8
II	—	—	615,0—610.5	615,5—610,0
III	—	—	599,0—594,8	599,5—594,0
IV	—	—	580,0—573,0	581,0—563,5 Schatten bis 557,0
V	567,8—565,8	568,5—565,5	569,0—565,0	
Va	—	—	560,5—557,3	
Vb	—	—	—	—
VI	—	Schatten von 530,3 526,0—522,0 Schatten bis 519,0	535,0—519,0	536,0—517,0
VII	—	505,5—481,8	506,5—479,0	509,5—478,3

Photographien (Tafel I. Phylloporphyrin oben, Mesoporphyrin unten) deutlich zeigen. Das letzte, am stärksten gebrochene Band des Phylloporphyrins wie auch des Mesoporphyrins ist bekanntlich ein zusammengesetztes.[1]) Auf den ersten Blick erscheinen innerhalb desselben bei entsprechender Verdünnung bzw. Schichtendicke 3 Streifen, bei genauer Beobachtung ergeben sich jedoch 4, der erste, schwächere am weniger gebrochenen Rand. Die photographische Platte differenziert nicht genügend, sie läßt nur 3 Streifen erkennen.

Außer den Bändern des sichtbaren Spektrums verursacht Phylloporphyrin im Ultraviolett noch 2 Bänder, wie Marchlewski[2]) zeigte. Wir haben jetzt die Lage derselben in Wellenlängen bestimmt. Die hierzu benutzte photographische Methode wurde von dem einen von uns bereits ausführlich beschrieben, und können wir uns auf das früher Gesagte beziehen[1]); wir bemerken nur, daß zur Ermittlung der Lage der Bänder in diesem Falle die Kupferlinien benutzt wurden, und zwar: 470,5, 465,1, 458,7, 448,1, 437,8, 427,5, 417,8, 406,3, 402,3, 386,1, 370,1, 365,6, 360,2, 359,9, 353,0, 351,2, 348,4, 347,6, 338,2, 336,6, 333,8.

Die photographierte Lösung war sehr verdünnt; 5 ccm der gesättigten Lösung wurden auf 50 ccm verdünnt. Photographiert wurden 2, 4, 6, 8, 10, 12 mm dicke Schichten. Nur in der

[1]) Marchlewski, Die Chemie der Chlorophylle usw. Braunschweig 1909, S. 187.

[2]) Bull. de l'Acad. d. Sc. de Cracovie 1902, 224.

lösung; 1 l = 0,26 g.

30 mm	40 mm	50 mm	90 mm	120 mm
—	—	—	—	650,5—647,0
625,5—617,0 615,8—609,3	626,5—617.0 Schatten bis 609,0	627,0—608,8	629,0—608,0	630—
599,8—593,5	599,8—593,3	599,8—593,0	599,8—593,0	
581,5—561,5 Schatten bis 555,3	583,3—561,0 Schatten bis 555,3	585,0—554,8	588,5—552,5	
544,3—541,5	544,5—541,3	544,5—541,0	545,0—	
536,3—516,5	536,5—	537,5—	—	
512,0—	—	—	—	

6 mm-Schicht erschien das zweite, stärker gebrochene Band einigermaßen deutlich:

Schichtendicke	Band I	Band II
2 mm		391,5 bis 402,0
4 „		389,0 „ 404,0
6 „	364,5 bis 375,5	387,0 „ 406,5
8 „	363,5	410,5
10 „	358,5	412,5
12 „	355,5	415,5

Die Absorptionen des Phylloporphyrins in überschüssiger 10%iger Salzsäure haben wir jetzt auch in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die Messungen begannen mit einer Lösung, die in 10 mm-Schicht eine Totalabsorption bei 611,8 verursachte. Das übrige ersieht man aus folgender Zusammenstellung (s. erste Tab. S. 214 u. 215).

Außerdem verursachen die salzsauren Lösungen des Phylloporphyrins, wie C. A. Schunck fand, ein Absorptionsband im Ultraviolett.

In Eisessig gelöst, zeigt das Phylloporphyrin folgende Absorptionsverhältnisse (s. zweite Tab. S. 214 u. 215).

Ein gewisses Interesse beansprucht noch die Zinkverbindung des Phylloporphyrins. Dieselbe wurde von Schunck und Marchlewski kurzweg als „Zinksalz" bezeichnet. Sie zeigte sich vollkommen dem „Zinksalz" des Hämatoporphyrins analog. Späterhin wies Marchlewski darauf hin, daß der Charakter dieser Verbindung ein ganz anderer ist als der des Natriumsalzes, und da der Hämatoporphyrinester, der keine sauren

Konzentration	A.	B. 2,5 A + 0,5 HCl	C. 3,0 B + 0,5 HCl	D. 3,5 C + 0,5 HCl
I	611,8	607,3	604,8	
II				
III				602,8—494,0
IV				
V				

Konzentration	J. 5 I + 1 HCl	K. 5 J + 1 HCl	L. 5 K + 1 HCl	M. 5 L + 1 HCl
I	596,5—583,3	596,0—583,5	595,0—583,5	594,8—584,0
II		Schatten von 575,3	575,3—465,8	573,8—566,0
III	575,5—530,5	561,5—532,0	559,5—533,5	558,0—534,0
IV	528,0—519,0	527,8—519,3	undeutlich	—
V	511,8—502,0	510,7—502,5		—

Konzentration	A.	B. 5 A + 1 Essigs.	C. 5 B + 1 Essigs.	D. 5 C + 1 Essigs.
I				
II				
III	Totalabsorption	Totalabsorption	Totalabsorption	
IV	von 608,8	von 607,3	von 606,8	605,5—482,3
V				
VI				

Konzentration	I. 5 H + 1 Essigs.	J. 5 I + 1 Essigs.	K. 5 J + 1 Essigs.	L. 5 K + 1 Essigs.
I	602,3—596,0	602,0—596,3	601,8—596,5	601,5—596,8
II	Schatten bis 589,8	594,3—589,8	594,0—590,5	592,8—590,3
III				570,3—563,3
IV				
IVa	575,5—512,8	573,0—513,0	571,0—517,3	562,5—540,5
V				531,5—527,5
VI				524,5—519,5

Eigenschaften mehr besitzt, doch noch eine Zinkverbindung zu bilden vermag, deren spektroskopisches Verhalten der Zinkverbindung des freien Mesoporphyrins bzw. Phylloporphyrins durchaus analog ist, so schloß Marchlewski, daß bei der Bildung dieser Zinkverbindungen ganz andere Gruppen reagieren als bei der Bildung der Alkalisalze. Dieses Verhalten des Phylloporphyrins ist übrigens nichts grundsätzlich Neues im Gebiet der Chlorophyllchemie. Beobachtete doch Schunck, daß Phyllocyanin ein Natriumsalz liefern kann, das von den „Salzen" der schweren Metalle sich grundsätzlich verschieden

E. 4 D + 1,0 HCl	F. 5 E + 1 HCl	G. 5 F + 1 HCl	H. 5 G + 1 HCl	I. 5 H + 1 HCl
602,0—496,5	600,8—497,8	600,0—524,0 Schatten bis 497,0	597,0—583,0 576,0—529,0 Schatten bis 518,3	596,8—583,3 576,0—529,8 Schatten bis 519,5

N. 5 M + 1 HCl	O. 5 N + 1 HCl	P. 5 O + 1 HCl	Q. 5 P + 1 HCl	R. 5 Q + 1 HCl
594,5—585,3 572,3—566,8	594,3—585,3 571,3—567,5	594,0—588,5 571,0—567,8	593,8—588,6 570,8—568,0	593,5—588,8 —
556,5—534,0	556,3—535,5	555,0—536,0	555,0—536,3	554,8—540,8 Schatten bis 536,5
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—

E. 5 D + 1 Essigs.	F. 5 E + 1 Essigs.	G. 5 F + 1 Essigs.	H. 5 G + 1 Essigs.
604,8—489,0	604,3—587,5 578,8—501,5	604,0—589,3 578,8—508,5	602,5—596,3 Schatten bis 589,8 577,5—509,0

M. 5 L + 1 Essigs.	N. 5 M + 1 Essigs.	O. 5 N + 1 Essigs.	P. 5 O + 1 Essigs.
601,0—596,5	600,8—597,0	600,5—597,3	600,3—597,5
—	—	—	—
570,0—566,0	569,8—566,0	569,5—566,3	569,0—566,5
561,0—544,0	560,5—544,8	560,5—548,5	560,3—556,8 554,0—549,0
531,5—527,8	531,3—528,3	531,5—528,5	531,5—529,0
524,0—520,5	524,0—520,8	524,0—521,0	523,8—522

verhielt. Letztere wurden schon längst als sog. komplexe Salze aufgefaßt, in denen das Metall nicht Ionencharakter besitzt, und das „Zinksalz" des Phylloporphyrins schien sich diesen komplexen Verbindungen anzugliedern. Der Rolle des Säureradikals der bei der Bildung der komplexen Verbindungen der Chlorophyllderivate angewandten Schwermetallsalze wurde aber bis vor kurzem keine Aufmerksamkeit geschenkt. Erst Marchlewski wies darauf hin, daß das Zinkchlorophyll, das durch die Einwirkung von CO_2 und $Zn(OH)_2$ auf Chlorophyllan gebildet wird, Kohlensäure durch Säurebehandlung nicht abspaltet,

und es war daher wahrscheinlich, daß auch bei der Bildung anderer komplexer Verbindungen von Chlorophyllderivaten die Säure des Schwermetallsalzes abgespalten wird und in das Molekül der komplexen Verbindung nicht aufgenommen wird. Wir haben durch einen direkten Versuch diese Angelegenheit geprüft. 0,1 g der Zinkverbindung des Phylloporphyrins wurden mit 5 ccm konz. Schwefelsäure unter Rückfluß auf dem Wasserbade erwärmt, dann mit 300 ccm Wasser verdünnt und in eine Vorlage destilliert. Das Destillat wurde alkalisch gemacht und eingedampft. Der Rückstand, stark sulfithaltig, wurde mit Essigsäureanhydrid erwärmt behufs Prüfung auf Essigsäure, dabei wurde kein Kakodylgeruch wahrgenommen.

Das obige Resultat der Neuuntersuchung des Phylloporphyrins veranlaßt uns, zu einer Arbeit von Willstätter und Fritsche Stellung zu nehmen, die die genannten Autoren vor zwei Jahren unter dem Titel „Über den Abbau von Chlorophyll durch Alkalien" publizierten.[1]) Sie isolierten bei der Verarbeitung von Alkachlorophyll vier rotgefärbte Substanzen, das Glauko- und Rhodoporphyrin sowie Pyrro- und Phylloporphyrin. Nur die beiden letzteren zeigen Ähnlichkeit mit dem Phylloporphyrin, das Gegenstand der vorliegenden Mitteilung bildet, und das, wie bereits betont, mit dem Phylloporphyrin von E. Schunck und Marchlewski identisch ist. Um einer unliebsamen Verwechslung vorzubeugen, werden wir die beiden letzten Willstätterschen Porphyrine in den folgenden Betrachtungen als Porphyrin α (Willstättersches Pyrroporphyrin) und Porphyrin β bezeichnen, das unsrige wie zuvor Phylloporphyrin nennen. Die beiden Porphyrine W.s sind sich ziemlich ähnlich, unterscheiden sich aber in bezug auf das optische Verhalten und Basizität. Das Porphyrin α wird der ätherischen Lösung etwa zur Hälfte durch $1^1/_2$%ige Säure entzogen, das Porphyrin β ist stärker basisch und geht bereits in gleichem Betrage (bei Anwendung gleicher Volume der Farbstoff-Ätherlösung und Salzsäure) in $^1/_2$%ige Säure über. Die Lösung des ersten in Salzsäure ist blaurot, die des zweiten bräunlichrot. In bezug auf das früher von Schunck und

[1]) Liebigs Annalen 358, 205.

Marchlewski beschriebene Phylloporphyrin äußern sich die genannten Verfasser in folgender eigenartiger Weise, unter der für sie feststehenden Annahme, daß das von uns untersuchte Produkt ein Gemisch von Porphyrin β und α war; „der Widerspruch zwischen der gesamten Beschreibung des Phylloporphyrins von Schunck und Marchlewski und den Angaben über das Absorptionsspektrum erklärt sich wohl nur mit der Annahme, daß sich die Beschreibung auf ein an Phylloporphyrin reiches Gemisch der Porphyrine bezieht, wie es als Rohprodukt erhalten worden sein mag, daß aber für die Spektralbeobachtung des durch Umkrystallisieren daraus isolierten schwerer löslichen Pyrroporphyrins gedient hat." (!) Zu dieser befremdenden Annahme führt Willstätter in erster Linie der Befund seiner spektroskopischen Untersuchungen seines Porphyrins α; er kommt zu dem Schluß, daß sein Resultat mit dem Marchlewskischen ausgezeichnet übereinstimmt. Letzterer hatte allerdings nur die Messungen für eine Konzentration angegeben, Willstätter dagegen in dem Bewußtsein, daß dies nicht genügt, gibt sie für 5 Schichtendicken; es muß also angenommen werden, daß Willstätter diese Messungen zur Identifizierung seines Produktes als ausreichend erachtet. Wir betonen unter diesen Umständen, daß das Spektrum des Phylloporphyrins von Schunck und Marchlewski von dem des Porphyrins α entgegen der Annahme Willstätters sehr markant divergiert, ein Schluß, der bereits aus der Zusammenstellung, die Willstätter selbst gegeben hat, zu ziehen ist. Es heißt nämlich:

	Phylloporphyrin nach Marchlewski	Porphyrin α
Band I	625,0—620,0	624—621 ... 613
„ II	616,0—610,0	
„ III	600,0—595,0	599—594,5
„ IV	581,0—573,0	583 ... 570—565
„ V	570,0—566,0	
„ VI	536,0—520,0	531,5—523,5 ... 520,5
„ VII	506,0—478,0 (gerippt mit 4 dunklen Streifen)	505,0—481,0 (gerippt mit 3 dunklen Streifen).

Das Porphyrin α besitzt also kein selbständiges Band 616—610, ebenso erscheint zwischen 581,0—566 kein Doppel-

band, sondern nur ein Band mit einem Schatten, endlich enthält das letzte Band nur 3 Dunkelheitsmaxima und nicht 4. Ähnlich verhält es sich bei anderen von Willstätter untersuchten Schichtendicken. Bänder, die den Wellenlängen 615,0 bis 610,5, 560,5—557,3, 544,3—541,5 entsprechen würden, fand Willstätter bei keiner Konzentration bzw. Schichtendicke. Daraus ist zu schließen, daß Willstätters Substanz sehr markant von den Blutporphyrinen, besonders von dem Mesoporphyrin optisch unterschieden ist, während das längst bekannte Phylloporphyrin von Schunck und Marchlewski auch in bezug auf diese subtilen Einzelheiten dem Mesoporphyrin durchaus analog ist. Dasselbe gilt in bezug auf die Absorptionsmaxima des letzten Bandes.

Nicht geringer sind die Unterschiede im Spektrum der Lösungen beider Substanzen in überschüssiger Salzsäure. Willstätter findet nur 3 Bänder, wir finden in unserem Präparat 5, ebenso bei entsprechender Konzentration das alte Phylloporphyrin, wie Marchlewski früher angab. Von Absorptionen im Ultraviolett ist hierbei nicht die Rede. Kurz zusammengefaßt, läßt sich aus dem obigen schließen, daß in optischer Beziehung das Phylloporphyrin von Schunck und Marchlewski, das mit dem von Robel und Marchlewski in allen Stücken gleich ist, von dem „Pyrroporphyrin" durchaus verschieden ist. Das Porphyrin β, das so von Willstätter genannte Phylloporphyrin, braucht hier überhaupt nicht näher besprochen zu werden, eine solche Substanz haben weder Schunck und Marchlewski, noch jetzt wir bei der Verarbeitung von Phyllotaonin beobachtet.

Gehen wir jetzt zu den anderen Eigenschaften der verglichenen Substanzen über.

Nach Willstätter und Fritsche wird die ätherische Lösung des Porphyrins α durch $1^1/_2$ %ige Säure zur Hälfte extrahiert. Die unserige wird durch 1%ige Säure mehr als zur Hälfte extrahiert, und doch besitzt sie ein total verschiedenes Spektrum von dem Porphyrin β der genannten Autoren. Dies folgt aus folgender Zusammenstellung der Extinktionskoeffizienten der Salzsäureschichten, die durch sukzessive Extraktionen derselben Phylloporphyrinmenge (bei ständiger Innehaltung desselben Äthervolumens) erhalten wurden:

λ: 570	1. Extraktion	E = 0,5628
	2. „	E = 0,2486
	3. „	E = 0,1141
	4. „	E = 0,0091
	5. „	E = —
	6. „	E = —
	Rückständige Ätherlösung	E = 0,2121
	Ursprüngliche Phylloporphyrinlösung	E = 1,6060

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß das Phylloporphyrin durch $1\,^0/_0$ige Säure nahezu vollständig der ätherischen Lösung entzogen werden kann. Daß diese Löslichkeit durch das Vorhandensein eines stärker basischen Produktes (Porphyrin β) nicht vorgetäuscht wird, folgt daraus, daß der aus der 1. Säurefraktion gewonnene und in Äther aufgenommene Farbstoff in spektraler Beziehung durchaus der ursprünglichen Lösung entsprach. Der Unterschied zwischen dem eigentlichen Phylloporphyrin und dem Porphyrin α tritt also auch in bezug auf die Basizität stark hervor.

Was die anderen, numerisch schwieriger zu verfolgenden Eigenschaften der verglichenen Substanzen anbelangt, so ist ein Urteil dadurch erschwert, daß Willstätter und Fritsche nicht angeben, mit welcher von den zwei von ihnen gefundenen Modifikationen des Pyrroporphyrins die einschlägigen Versuche ausgeführt worden sind. Abgesehen davon kann unmöglich eine Substanz wie Pyrroporphyrin von Phylloporphyrin (im Sinne Willstätters) auf Grund des Satzes, der die letztere charakterisieren soll, nämlich „die salzsaure Lösung gibt beim Schütteln mit Äther an letzteren nichts ab, auch nicht in dem Falle, wenn man die Lösung stark mit Wasser verdünnt", unterschieden werden. Eine solche Eigenschaft wird eine Substanz mit der „Basizität $1^1/_2\,^0/_0$ HCl" und eine solche mit der „Basizität $^1/_2\,^0/_0$ HCl" besitzen.

Faßt man alles Gesagte zusammen, so kommt man zu folgenden Schlüssen. Von den von Willstätter und Fritsche beschriebenen Porphyrinen hat nur das „Pyrroporphyrin" eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Phylloporphyrin von Schunck und Marchlewski. Beide Substanzen unterscheiden sich in bezug auf ihre Basizität und besonders in bezug auf die spektralen Eigenschaften. Diese Verschiedenheit könnte einerseits

in der ungleichen Reinheit beider gesucht werden, oder in ihrer tatsächlichen Verschiedenheit. An die letztgenannte Möglichkeit haben wir vor allem gedacht, besonders da unser Ausgangsmaterial vorwiegend immer nur Phyllotaonin war; allein diese Annahme ist unwahrscheinlich, weil das echte Phylloporphyrin schon früher von Marchlewski auch aus Alkachlorophyll dargestellt wurde, und weil das echte Phylloporphyrin jetzt von uns auch aus dem Verseifungsprodukt des Chlorophyllans erhalten wurde und zwar immer gefolgt von einem stärker basischen Produkt, das dem Porphyrin β entsprechen dürfte. Was die erste Möglichkeit anbelangt, so glauben wir gezeigt zu haben, daß unserem Produkt Verunreinigungen, die sein optisches Vermögen beeinflussen würden, nicht anhaften können, wir haben gezeigt, daß diejenigen optischen Merkmale, die das Phylloporphyrin vom Pyrroporphyrin unterscheiden, das Phylloporphyrin mit dem Mesoporphyrin des Blutfarbstoffs verknüpfen, und es wäre in der Tat beispiellos, wenn diese subtilen optischen Merkmale nicht der Substanz eigen wären, sondern auf zufällige Verunreinigungen zurückzuführen wären. Der Vorwurf der Uneinheitlichkeit trifft viel eher das Pyrroporphyrin, dem vielleicht ein schwächer basisches Produkt beigemischt war; ausgeschlossen ist es aber auch nicht, daß eine Nachprüfung der „Basizität" im Falle des Pyrroporphyrins zu anderen Resultaten führen wird, sowie auch, daß eine nochmalige Durchmusterung der Spektra bei nicht zu kleiner Dispersion und mittlerer Beleuchtung (zu große Lichtstärke ist ebenso zu verwerfen wie eine zu schwache) dieselben subtilen Eigenschaften aufweisen wird wie unser Porphyrin. Für uns ist der Name Pyrroporphyrin von keiner Bedeutung mehr; unter diesem Namen tauchte das längst bekannte Phylloporphyrin auf, ohne welchem eine Weiterentwicklung der Chemie des Chlorophylls nicht zu denken war. Dagegen ist das Porphyrin β eine neue Substanz, die früher nicht beobachtet wurde; es scheint, aber sicher ist dies nicht, daß sie aus dem Phyllotaonin nicht gebildet wird. Einen zweckentsprechenden und nicht irreführenden neuen Namen für dieselbe in Vorschlag zu bringen, überlassen wir natürlich den Entdeckern.

Bezüglich der empirischen Formel des Phylloporphyrins sich auszusprechen, halten wir für verfrüht. Die erste von

Schunck und L. Marchlewski[1]) angegebene lautet $C_{32}H_{34}N_4O_2$; später wurden von denselben Autoren $C_{16}H_{18}N_2O$ (also auch $C_{32}H_{36}N_4O_2$) in Erwägung gezogen.[2]) Willstätter und Fritsche[3]) befürworten ebenfalls $C_{32}H_{36}N_4O_2$. Eine Entscheidung, besonders im Zusammenhange mit dem Mesoporphyrin, versprechen wir uns vom Studium des Phyllohämins, das den Gegenstand einer folgenden Mitteilung bilden wird, und welches entgegen den Zweifeln von Willstätter spielend leicht aus Phylloporphyrin entsteht.[4])

[1]) Liebigs Annalen 284, 95, 1894.
[2]) Ebenda 290. 306.
[3]) l. c.
[4]) l. c. S. 50.

Über die Regeneration von Eiweiß in der Magenschleimhaut.

Von

P. Glagolew.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Medizinischen Hochschule für Frauen, St. Petersburg.)

(Eingegangen am 28. März 1911.)

Der Regeneration von Eiweiß in der Magenschleimhaut muß natürlich eine Resorption vorausgehen; sollte bewiesen werden, daß aus dem Magen kein Eiweiß resorbiert wird, so könnte natürlich von einer Eiweißregeneration in der Magenschleimhaut keine Rede sein. Über diesen Gegenstand sind jedoch verschiedene Forscher geteilter Meinung.

Ohne auf die entsprechenden Arbeiten näher einzugehen, bemerke ich jedoch, daß durch die Arbeiten von Tobler[1]), G. Lang[2]) u. a. gewichtige Gründe für das Vorhandensein einer Resorption beigebracht sind.

Hofmeister[3]) gelangte seinerzeit zur Ansicht, daß im Magen resorbiertes „Pepton" in der Magenschleimhaut regeneriert wird. Das Pepton wurde colorimetrisch bestimmt. Bestätigt wurde diese Ansicht durch eine von Glaeßner[4]) im Laboratorium von Hofmeister ausgeführte Untersuchung, bei der das Pepton durch Aussalzen mit $ZnSO_4$ bestimmt wurde. Über diese Resultate sagt Noorden[5]): In Anlehnung

---

[1]) Tobler, Über die Eiweißverdauung im Magen. Zeitschr. f. phys. Chem. 45, 185, 1905.

[2]) G. Lang, Über Eiweißverdauung und Eiweißresorption im Magen des Hundes. Diese Zeitschr. 2, 225, 1906.

[3]) Hofmeister, Verhalten des Peptons in der Magenschleimhaut. Zeitschr. f. phys. Chem. 6, 69, 1881.

[4]) Glaeßner, Umwandlung der Albumosen durch Magenschleimhaut. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 328, 1902.

[5]) Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden, 1906, S. 79.

an die von Salaskin verlautbarten Bedenken,[1]) daß Glaeßners Versuchsergebnisse auch anders ausgelegt werden können, als Glaeßner es tut, der in ihnen den Beweis für eine Regeneration der resorbierten Albumosen in der Magenschleimhaut erblickt.

Nach Salaskins Meinung können die von Glaeßner in der Magenschleimhaut eines gefütterten Hundes nachgewiesenen Albumosen örtlicher Entstehung sein, d. h. von Metamorphosen der in Tätigkeit befindlichen Drüsenzellen herrühren. Sollte dieses der Fall sein, so könnte nur von einer Regeneration von Albumosen, die sich an bestimmten Orten gebildet haben, die Rede sein, also von einer Regeneration, die von einem Übergang tätiger Zellen in den Ruhestand begleitet ist. In letzterem Falle stehen die Ergebnisse von Glaeßner in keinerlei genereller Beziehung zu den Wandlungen des Nahrungseiweißes, sondern weisen auf einige chemische Vorgänge bei der Arbeit der Verdauungsdrüsen hin.

Zur Klärung der Verhältnisse habe ich auf Veranlassung von Prof. S. Salaskin die entsprechenden Versuche angestellt, bei denen ich mich der Hilfe von Frau K. Kowalevsky zu erfreuen hatte. Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt.

Die Hunde wurden durch Aderlaß (A. femoralis) getötet, der ausgeschnittene Magen sorgfältig in physiologischer warmer NaCl-Lösung gewaschen, nach den Kurvaturen in zwei symmetrische Hälften geteilt, die Schleimhäute möglichst schnell abpräpariert, zwischen Filtrierpapier getrocknet und gewogen; die eine Hälfte diente gewöhnlich zu Kontrollbestimmungen und wurde sofort bearbeitet, die andere kam auf 1, 3 oder 6 Stunden in einen Thermostat.

Die untersuchten Schleimhäute entsprachen verschiedenen Stadien der Verdauungstätigkeit; sie stammten:

1. von hungrigen Hunden (Ruhe der Verdauungsdrüsen);
2. von ösophagotomierten Hunden mit einer Magenfistel, getötet nach einer Scheinfütterung (rege Tätigkeit der Drüsen);
3. von Hunden nach einer großen (= 1000 g) Fleischgabe; zwecks besserer Vergleichbarkeit der Resultate wurden die gefütterten Hunde in demjenigen Verdauungsstadium getötet, für das Glaeßner die stärkste Albumosenregeneration (bis 75,8 %) findet, nämlich in der 7. Stunde der Verdauungstätigkeit.

---

[1]) Salaskin, Über das Vorkommen des Erepsins im reinem Darmsaft des Hundes. Zeitschr. f. phys. Chem. 35, 425, 1902.

Die chemische Untersuchung wurde im allgemeinen ebenso ausgeführt wie bei Glaeßner, mit einigen von Knoop und Embden[1]) vorgeschlagenen Abänderungen.

Die wie oben beschrieben abpräparierten Schleimhäute wurden an einem Faden in kochende 1%ige KH_2PO_4-Lösung getaucht, 10 Minuten in einem Kolben mit senkrechtem Rückflußkühler gekocht, dann aus dem Kolben genommen, sorgfältig zerkleinert und wieder 20 Minuten gekocht.[2])

Darauf wurde der Kolbeninhalt — Flüssigkeit und feste Teile — in einen Meßzylinder gebracht und bis zum nächsten Tage in der Kälte stehen gelassen.

Das Gesamtvolumen (gewöhnlich 500 ccm) wurde genau bestimmt, die Flüssigkeit abfiltriert und aliquote Teile: 1. zur N-Bestimmung nach Kjeldahl benutzt, 2. mit $ZnSO_4 + H_2SO_4$ (2 ccm 20%iger Säure auf 100 ccm Versuchslösung) zu $^1/_3$ gesättigt, und 3. vollständig mit $ZnSO_4$ und entsprechenden Säuremengen gesättigt.

Die mit $ZnSO_4$ gefällten Proben gaben nach 3 bis 4tägigem Stehen in der Kälte klare, farblose Filtrate; bei Anwendung $^1/_3$ gesättigter $ZnSO_4$-Lösung fielen die letzten Spuren von Eiweiß, Muzin, Globin aus; im Filtrat waren also außer den nicht aussalzbaren Stoffen noch die Albumosen vorhanden — während das Filtrat der mit $ZnSO_4$ vollständig gesättigten Proben nur die nicht aussalzbaren Stoffe enthielt. Die Differenz des Stickstoffgehaltes beider Filtrate gibt den Stickstoffgehalt der Albumosen.

Alle Reagenzien wurden auf einen Stickstoffgehalt geprüft und das benutzte Wasser von spurenweise vorhandenem NH_3 durch Destillation mit H_3PO_4 befreit. Die Bestimmungen des Stickstoffes nach Kjeldahl wurden in 2 bis 3 Portionen von je 50 ccm ausgeführt; als Indicator diente ein gutes Lackmoidpräparat, die Titrationen wurden mit $^n/_{10}$-H_2SO_4 und $^n/_{20}$-KOH ausgeführt.

Beschreibung der Versuche.

Zuerst mußte festgestellt werden, ob die zu bestimmenden Stoffe gleichmäßig in der Schleimhaut verteilt waren. Zu diesem Zwecke wurde die Magenschleimhaut eines Hundes nach 24stündiger Nahrungsentziehung benutzt. Die beiden symmetrischen Hälften der abpräparierten Magenschleimhaut wurden gleich nach der Wägung untersucht. (Tab. I.)

---

[1]) Knoop und Embden, Verhalten des Albumosen in der Darmwand und Vorkommen von Albumosen im Blut. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 120, 1903.

[2]) Bei Glaeßners Versuchen wurde die Substanz vor dem Kochen zerkleinert.

Tabelle I.

Nr.	Gewicht d. Schleimhautproben g	Flüssigkeitsvolumen nach d. Auskochen mit KH_2PO_4 ccm	Stickstoffgehalt der Filtrate ausgekocht mit KH_2PO_4 %	gefällt mit $ZnSO_4$ $^1/_2$ gesättigt %	gesättigt %	Albumosenstickstoff %
1 a	36	500	0,3084	0,2712	0,1615	0,1097
b	31,8	500	0,3376	0,2773	0,1691	0,1082

Der Versuch zeigt, daß die Albumosen und die nicht aussalzbaren Stoffe gleichmäßig verteilt sind, so daß die Stickstoffzahlen beider symmetrischer Schleimhauthälften ohne weiteres miteinander vergleichbar sind.

Der nächste Versuch sollte entscheiden, in welcher Richtung sich im Thermostat der Schleimhautstickstoffgehalt ruhender und tätiger Magendrüsen verändert.

Tabelle II.

Nr.	Versuchsbedingungen	Gewicht der Schleimhautproben g	Flüssigkeitsvolumen nach d. Auskochen mit KH_2PO_4 ccm	Stickstoffgehalt der Filtrate ausgekocht mit KH_2PO_4 %	gefällt mit $ZnSO_4$ $^1/_2$ gesättigt %	gesättigt %	Albumosenstickstoff %
2	28 Stunden Hunger. Schleimhäute:						
	a) sofort untersucht . .	43,3	450	0,3183	0,1986	0,1465	0,0521
	b) nach $2^3/_4$ stündig. Verweilen im Thermostat	51,5	500	0,3452	0,2173	0,1580	0,0593
3	Oesophagotomierter Hund mit Magenfistel, am Versuchstage $1^1/_2$ Stunden Scheinfütterung. Schleimhäute:						
	a) sofort untersucht . .	51	500	0,3011	0,2059	0,1260	0,0799
	b) nach 3stündigem Verweilen im Thermostat	53	500	0,3896	0,2714	0,1585	0,1129

Der Tabelle ist ohne weiteres zu entnehmen, daß die Stickstoffmengen der Albumosen sowie der nicht aussalzbaren N-haltigen Produkte im Thermostaten anwachsen, und zwar unabhängig davon, ob die Verdauungsdrüsen der hungernden Hunde sich vor dem Versuche in Tätigkeit befanden oder nicht.

Weitere Versuche sind mit gefütterten Hunden angestellt. Bei einem Versuche wurden dem Hunde 1000 g Fleisch am Versuchstage nach vorhergegangener 24stündiger Nahrungsentziehung gegeben, in den übrigen 6 Versuchen erhielten die Hunde noch geringere Fleischgaben am Vorabend des Versuchstages.

Die Tabelle III zeigt, daß auch bei Versuchen mit gefütterten Hunden beim Aufbewahren der Schleimhaut im Thermostat ein gleiches Anwachsen der extrahierbaren Stickstoffmenge vor

Tabelle III.

Nr.	Versuchsbedingungen	Gewicht der Schleimhautproben g	Flüssigkeitsvolumen nach d. Auskochen mit KH_2PO_4 ccm	Stickstoffgehalt der Filtrate: ausgekocht mit KH_2PO_4 %	gefällt mit $ZnSO_4$: $^1/_2$ gesättigt %	gefällt mit $ZnSO_4$: gesättigt %	Albumosenstickstoff %
4	Fleischgabe 1000 g nach 24stündiger Nahrungsentziehung, gereicht $6^1/_4$ Std. vor der Tötung.						
	Schleimhäute:						
	a) sofort untersucht . .	40,5	400	0,2352	0,1916	0,1600	0,0316
	b) nach 3stündigem Verweilen im Thermostat	39,2	450	0,2760	0,2234	0,1854	0,0380
5	Fleischgabe 500 g am Vorabend, 1000 g 5 Stunden vor der Tötung.						
	Schleimhaut:						
	a) sofort untersucht . .	46,0	500	0,3083	0,2533	0,1410	0,1123
	b) nach 3stündigem Verweilen im Thermostat	41,6	500	0,3651	0,2877	0,1635	0,1242
6	Fleischgabe wie oben, Tötung $6^1/_2$ Stunden nach der Fütterung.						
	Schleimhäute:						
	a) sofort untersucht . .	33,5	500	0,3393	0,2275	0,1416	0,0859
	b) nach $1^1/_4$stündig. Verweilen im Thermostat	33,5	500	0,3907	0,2770	0,1817	0,0953
7	Welpe von 4 kg, am Versuchstage 400 g Fleisch 4 Stunden vor der Tötung.						
	Schleimhäute:						
	a) sofort untersucht . .	15,3	250	—	0,2491	0,1555	0,0936
	b) nach 3stündigem Verweilen im Thermostat	18,0	250	—	0,3120	0,2100	0,1020

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Versuchsbedingungen	Gewicht der Schleimhautproben g	Flüssigkeitsvolumen nach d. Auskochen mit KH_2PO_4 ccm	Stickstoffgehalt der Filtrate: ausgekocht mit KH_2PO_4 %	gefällt mit $ZnSO_4$: $^1/_2$ gesättigt %	gefällt mit $ZnSO_4$: gesättigt %	Albumosenstickstoff %
8	Durch eine Sonde die Verdauungsprodukte von 1,6 kg Fleisch in Magensaft gegeben, 4 Stunden vor der Tötung.						
	Schleimhäute:						
	a) sofort untersucht . .	19	350	—	0,2811	0,1393	0,1418
	b) nach 3stündigem Verweilen im Thermostat	22	350	—	0,3276	0,1477	0,1799
9	Gefüttert wie in Nr. 5. Fundus- und Pylorusteile gesondert untersucht.						
	Fundusteile:						
	a) sofort untersucht . .	26	400	0,2346	0,2022	—	—
	b) nach 3stündigem Verweilen im Thermostat	32,5	400	0,2533	0,2202	—	—
	Pylorusteile:						
	a) sofort untersucht . .	7,7	180	—	0,2289	—	—
	b) nach 3stündigem Verweilen im Thermostat	12,4	180	—	0,2715	—	—
10	Gefüttert wie in Nr. 5, 6 Std. vor der Tötung.						
	Untersucht:						
	a) die abpräpar. Schleimhaut nach 3stünd. Verweilen im Thermostat	50	500	0,4176	0,3080	0,1944	0,1136
	b) die von einem 3 Std. im Thermostat aufbewahrten Magenteil abpräpar. Schleimhaut .	41	500	0,3512	0,3023	0,1953	0,1070

sich geht, wie es beim Untersuchen der Magenschleimhaut hungernder Hunde der Fall war; dieses Anwachsen tritt, wie der Versuch 9 beweist, sowohl im Fundusteil als auch im Pylorusteil auf; ob die separierte Magenschleimhaut allein oder der betreffende ganze Magenteil dem Thermostaten ausgesetzt war, spielt nach Versuch 10 keine Rolle.

Die Versuchsergebnisse weisen eindeutig darauf hin, daß in den Schleimhäuten bei 3 bis $3^1/_2$stündigem Verweilen im Thermostaten ein und derselbe Prozeß sich abspielt, der von

einer Zunahme der Produkte hydrolytischer Spaltung der Eiweißstoffe begleitet ist; dieser Prozeß kommt immer zustande, es ist somit irrelevant, ob die Schleimhäute im Stadium der Verdauung (bei Fleischnahrung resp. Fütterung mit den Produkten der Fleischverdauung durch Magensaft) von den Versuchstieren genommen wurden, oder ob sie hungernden Hunden — mit ruhenden resp. tätigen Verdauungsdrüsen — entstammten.

Alle diese Umstände sprechen zugunsten der Annahme, daß eine gemeinsame Ursache allen diesen Erscheinungen zugrunde liegt, und daß diese Ursache mit dem Verweilen der Schleimhäute im Thermostaten aufs engste verknüpft ist. Zwei Vermutungen über die Ursache liegen nahe: 1. Verdauung der Schleimhaut durch anhaftende Magensaftspuren und 2. Autolyse der Gewebe. Neue Versuche mußten über die Wahrscheinlichkeit dieser Vermutungen Klarheit schaffen.

Im ersten Versuch wurde die eine der symmetrischen Magenschleimhauthälften mit einer schwachen Sodalösung ausgewaschen, um die Spuren von HCl zu neutralisieren, wenn solche an der Schleimhaut noch haften sollten — was übrigens unwahrscheinlich war, da die Schleimhaut mit Wasser gut gewaschen war.

In den weiteren Versuchen kam in die Feuchtkammer des Thermostaten Chloroform, und die Schleimhäute verblieben daselbst 3 resp. 6 Stunden.

Die erhaltenen Resultate sowie die näheren Versuchsbedingungen finden sich in der Tabelle IV. Die Fütterung der Versuchshunde war dieselbe wie in Nr. 5.

Der Versuch Nr. 11 zeigt, daß ein Spülen der Schleimhaut mit Sodalösung das Anwachsen des Stickstoffgehaltes nicht beeinflußt; im Fundusteil ergeben sich ohne die Sodaspülung und mit der Sodaspülung dieselben Stickstoffgehalte für die Summe der Albumosen und nicht aussalzbaren Stickstoffverbindungen; der Unterschied der betreffenden Zahlen für den Pylorusteil ist wohl auf Versuchsfehler zurückzuführen, die bei der geringen Einwage der betreffenden Schleimhautteile das Resultat stark beeinflussen.

Der Chloroformeinfluß ist bei 3stündigem Verweilen im Thermostaten sehr gering, tritt aber bei 6stündigem Verbleib der Präparate im Thermostaten deutlich zutage.

Vor den Versuchen war ich der Meinung, daß die Zellen durch Chloroform abgetötet werden und daher die Autolyse

verstärkt wird; die Versuche haben jedoch das entgegengesetzte Resultat ergeben, was wohl, meines Erachtens, darauf zurückzuführen ist, daß durch Chloroform nicht nur die Zellen abgetötet, sondern auch die autolytischen Prozesse gehemmt werden. In dieser Auffassung bestärken mich noch die Untersuchungsergebnisse Salkowskis und seiner Schüler.[1])

Tabelle IV.

Nr.	Versuchsbedingungen	Gewicht der Schleimhautproben g	Flüssigkeitsvolumen nach d. Auskochen mit KH_2PO_4 ccm	Stickstoffgehalt der Filtrate: ausgekocht mit KH_2PO_4 %	gefällt mit $ZnSO_4$: $^1/_2$ gesättigt %	gefällt mit $ZnSO_4$: gesättigt %	Albumosenstickstoff
11	Erwärmungsdauer im Thermostaten 6 Stunden.						
	a) Fundusteile, gewaschen mit physiol. Lösung .	30,0	400	0,7504	0,5656	—	—
	b) Fundusteile, gewaschen mit physiol. Lösung + 0,5% Na_2CO_3	27,5	400	0,7317	0,5641	—	—
	a) Pylorusteile, gewaschen mit physiol. Lösung .	6,5	170	—	0,5155	—	—
	b) Pylorusteile, gewaschen mit physiol. Lösung + 0,5% Na_2CO_3	7,0	170	—	0,4705	—	—
12	Erwärmungsdauer 3 Stunden.						
	a) in der Feuchtkammer des Thermostaten	48	550	0,5211	0,3032	0,2021	0,1011
	b) in der Feuchtkammer mit Chloroform . . .	48	550	0,5127	0,2987	0,2093	0,0824
13	Erwärmungsdauer 6 Stunden.						
	a) in der Feuchtkammer des Thermostaten	53	500	0,7150	0,4924	0,3233	0,1691
	b) in der Feuchtkammer des Thermostaten mit Chloroform	56	500	0,5775	0,4061	0,2595	0,1466

Daß die geschilderte Zunahme der extrahierbaren Stickstoffverbindungen von einer Gewebeautolyse herrührt, konnte noch durch histologische Untersuchungen bestätigt werden. Ich benutze die Gelegenheit, Herrn Prof. Dr. A. Dogiel für die liebenswürdige Anleitung und Hilfe bei diesen Untersuchungen meinen ergebensten Dank auszusprechen.

[1]) Salkowski, Zeitschr. f. phys. Chem. 63, 138, 1909. — Kikoji, ebenda 63, 109, 1909. — Yochimoto, ebenda 58, 341, 1908.

Die histologische Prüfung zeigte, daß nach 3 bis 6stündigem Verweilen im Thermostaten die Zellen stark verändert waren; nach 3 Stunden waren die Hauptzellen angeschwollen und ihre Umrisse unscharf; nach 6stündigem Verweilen in der Feuchtkammer des Thermostaten waren die Hauptzellen zum größten Teil ganz verschwunden und bloß die Zellkerne zu sehen; hier und dort waren einige stark geschwollene formlose Zellen vorhanden.

Es dürfte einiges Interesse bieten, daß an den Belegzellen deutliche Änderungen nicht zu bemerken waren.

Meine Versuchsergebnisse bestehen in folgendem:

1. In den beiden symmetrischen Magenschleimhauthälften eines Hundes, die gleich nach der Tötung des Versuchstieres einer Untersuchung unterzogen wurden, war der von den Albumosen und der von $ZnSO_4$ nicht aussalzbaren Stickstoffprodukten herrührende Stickstoff gleichmäßig verteilt.

2. Der Gehalt von N-haltigen Stoffen in der Magenwand ist nicht konstant, hängt aber auch nicht vom Ruhe- oder Tätigkeitszustande der Verdauungsdrüsen ab. Obgleich es irrelevant war, ob die Schleimhaut von hungernden oder gefütterten Hunden stammte, darf daraus doch nicht auf eine Nichtexistenz der Eiweißresorption im Magen geschlossen werden. Es sei daran erinnert, daß Abderhalden und London[1]) in den Dünndarmwänden, ganz unabhängig davon, ob im Darme Verdauungsprodukte waren oder nicht, annähernd denselben Gehalt an stickstoffhaltigen Stoffen fanden, und trotzdem ist es bis jetzt niemand eingefallen, die Eiweißresorption im Dünndarm in Frage zu stellen.

3. Die Herkunft der N-haltigen Stoffe, die in der Magenschleimhaut nachgewiesen wurden, ist bis jetzt nicht klargestellt; sie können, wenigstens zum Teil, in situ entstanden sein oder auch der Magenresorption entstammen.

4. In der Thermostatfeuchtkammer werden die isolierten Magenschleimhäute autolytisch zersetzt.

5. Unbewiesen bleibt nach wie vor, ob in der Magenschleimhaut Eiweiß regeneriert wird oder nicht.

---

[1]) Abderhalden und London, Weiterer Beitrag nach dem Ab- und Aufbau der Proteine im tierischen Organismus. Zeitschr. f. phys. Chem. 65, 251, 1910.

Die Muskelarbeit und deren ketogene Wirkung.

Von

L. Preti.

(Aus der Clinica delle malattie professionali dei R. R. Istituti clinici di perfezionamento di Milano.)

(Eingegangen am 28. März 1911.)

Mit 1 Figur im Text.

Bekanntlich kann Acetonurie, unabhängig von jederlei Krankheitszustand, beim Menschen entweder infolge unzureichender Nahrungszufuhr oder im Anschluß an eine länger andauernde kohlenhydratfreie Diät eintreten.

Mit den zwischen Acetonurie und Nahrungszufuhr bestehenden Beziehungen hatte ich mich in Gemeinschaft mit G. Ascoli [1]) bereits eingehend befaßt. Mit vorliegenden Untersuchungen verfolge ich nun den Zweck, den Einfluß der Muskelarbeit auf bereits vorhandene Acetonurie kennen zu lernen.

Die diesbezüglichen Versuche wurden sowohl an Hunden als auch an Menschen durchgeführt. Von ersteren wurden vorzugsweise die Weibchen dazu verwendet, da sich dieselben für den Katheterismus besser eignen als die Männchen. Bei den Tieren wurde Acetonurie hervorgerufen durch Entziehung der Nahrung und gleichzeitige Vornahme einiger Phlorizineinspritzungen. Beim Auftreten von Aceton im Harn wurde das Tier mit einer konstanten Menge Rindfleisch gefüttert. Die Tiere blieben die ganze Versuchszeit hindurch in Käfigen eingeschlossen, die mit Doppelböden versehen waren: der obere Boden, auf dem das Tier lagerte, bestand aus einem Metallnetz und diente zum Auffangen der Faeces, der darunter befindliche aber, aus Eisen-

[1]) G. Ascoli und L. Preti, Über alimentäre Gesetzmäßigkeiten der Acetonurie. Diese Zeitschr. 26.

blech gefertigte, trichterförmig gestaltete, zum Auffangen des Harns.

Es wurde der in 24 Stunden (von 9 Uhr früh bis 9 Uhr früh des darauffolgenden Tages) gelassene Harn aufgefangen und um diese Zeit auch der ev. in der Blase noch enthaltene mit Hilfe des Katheters daraus entleert. War nun einmal die in 24 Stunden ausgeschiedene Acetonmenge konstant geworden, so wurden die Tiere zum Arbeiten veranlaßt, indem man sie auf einer Tretbahn laufen ließ.

Die gleichen Versuche wurden am Menschen angestellt. Ich benutzte dazu einen wegen mangelhafter Nahrungszufuhr an Acetonurie leidenden Magenkranken. Demselben ließ ich durch die ganze Dauer der Versuche folgende Kost verabreichen: 100 g Fleischbouillon, 3 Eier, 100 g Hühnerfleisch. Ich ließ den Patienten so lange im Bette liegen, bis das Aceton im Harn eine konstante Ausscheidung erreicht hatte; nachdem er auf mein Geheiß wieder aufgestanden, ließ ich ihn die Treppen des Instituts bis zur Ermüdung wiederholt hinauf und hinab steigen. In den darauffolgenden Tagen Bettruhe!

Zur Acetonbestimmung wurde die Huppert-Messinger-sche Methode angewandt.

Versuch 1.

Hündin I, Gewicht 25 kg.

5. bis 6., 6. bis 7., 7. bis 8. IX. ohne Nahrung, Ruhe.
8. bis 9. IX. Ruhe; subcutane Injektion von Phlorizin 1 g.

Nahrung: 200 g Fleisch	Aceton	4,927 mg
9. bis 10. IX. wie 8. bis 9.	„	10,27 „
10. bis 11. IX. wie 8. bis 9.	„	72,802 „
11. bis 12. IX. wie 8. bis 9.	„	70,449 „
12. bis 13. IX. Arbeit 1 Stunde und dann wie 8. bis 9.	„	191,140 „
13. bis 14. IX. Arbeit 2 Stunden und dann wie 8. bis 9.	„	486,88 „
14. bis 15. IX. wie 8. bis 9.	„	325,21 „
15. bis 16. IX. wie 8. bis 9.	„	297,77 „
16. bis 17. IX. wie 8. bis 9.	„	203,11 „
17. bis 18. IX. Arbeit 1 Stunde und dann wie 8. bis 9.	„	525,06 „
18. bis 19. IX. wie 8. bis 9.	„	288,55 „
19. bis 20. IX. wie 8. bis 9.	„	228,55 „
20. bis 21. IX. Ruhe; verschmäht die Nahrung	„	136,66 „

Versuch 2.

Hündin II, Gewicht 22,500 kg.

21. bis 22., 22. bis 23., 23. bis 24., 24. bis 25. IX. ohne Nahrung; Ruhe.
25. bis 26. IX. Ruhe; subcutane Injektion von 1 g Phlorizin; Fleisch 200 g . . . . . Aceton 29,087 mg
26. bis 27. IX. wie 25. bis 26. . . . . „ 27,75 „
27. bis 28. IX. Arbeit 1 Stunde und dann wie 25. bis 26. . . . . „ 83,584 „
28. bis 29. IX. wie 25. bis 26. . . . . „ 35,47 „
29. bis 30. IX. Arbeit 1 Stunde und dann wie 25. bis 26. . . . . „ 90,48 „
30. IX. bis 1. X. wie 25. bis 26. . . . „ 54,516 „

Versuch 3.

Hündin III, Gewicht 27,200 kg.

1. bis 2., 2. bis 3., 3. bis 4. X. ohne Nahrung, Ruhe.
4. bis 5. X. Ruhe; subcutane Injektion von 1 g Phlorizin; Fleisch 150 g . . . . . Aceton 209,12 mg
5. bis 6. X. wie 4. bis 5. . . . . „ 514,56 „
6. bis 7. X. Arbeit 2 Stunden und dann wie 4. bis 5. . . . . „ 1017,8 „
7. bis 8. X. wie 4. bis 5. . . . . „ 629,04 „
8. bis 9. X. wie 4. bis 5. . . . . „ 502,68 „
9. bis 10. X. wie 4. bis 5. . . . . „ 322,13 „
10. bis 11. X. wie 4. bis 5. . . . . „ 291,34 „
11. bis 12. X. wie 4. bis 5. . . . . „ 195,07 „
12. bis 13. X. Arbeit 1 Stunde und dann wie 4. bis 5. . . . . „ 321,01 „
13. bis 14. X. Ruhe; Nahrung verschmäht . . . . . „ 49,232 „

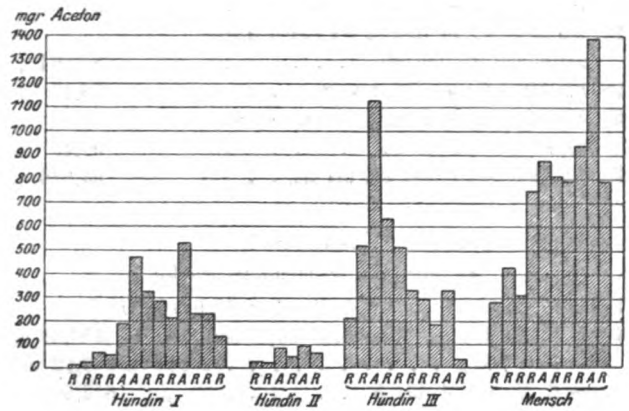
Versuch 4.

Mensch, Gewicht 52 kg.

Kost: Bouillon 1000 g, 3 Eier, Hühnerfleisch 100 g = N 11,9 g.

28. bis 29. IX. Ruhe; Harn 1300 ccm; Gesamt-N 13,05 g; Aceton 293,66 mg
29. bis 30. IX. „ „ 1400 „ „ 12,15 „ „ 421,29 „
30. IX. bis 1. X. „ „ 810 „ „ 11,8 „ „ 306,91 „
1. bis 2. X. „ „ 1180 „ „ 12,2 „ „ 757,6 „
2. bis 3. X. Arbeit; „ 950 „ „ 11,8 „ „ 884,99 „
3. bis 4. X. Ruhe; „ 1250 „ „ 12,9 „ „ 806,96 „
4. bis 5. X. „ „ 1100 „ „ 12,6 „ „ 799,48 „
5. bis 6. X. „ „ 900 „ „ 12,8 „ „ 922,48 „
6. bis 7. X. Arbeit; „ 1790 „ „ 11,7 „ „ 1390,9 „
7. bis 8. X. Ruhe; „ 1830 „ „ 12,0 „ „ 792,78 „

Was nun auf den ersten Blick bei obigen Tabellen auffällt, ist zunächst das verschiedene Verhalten der Acetonurie bei den einzelnen Tieren: dieselbe erweist sich nämlich als eine starke bei den Hündinnen I und III, als eine sehr gemäßigte hingegen bei Hündin II. Von dieser Feststellung vorläufig



R = Ruhetag. A = Arbeitstag.

Fig. 1.

abgesehen, ergibt sich, daß nach Muskelarbeit noch im Laufe desselben Tages eine Acetonzunahme eintritt. Läßt man in den darauffolgenden Tagen die Tiere ruhen, so nimmt auch das Aceton allmählich ab, um dann wieder eine Steigerung zu erfahren, sobald man die Tiere wieder arbeiten läßt.

Der am Menschen angestellte Versuch hat das gleiche Resultat geliefert, wie dies aus den Protokollen und der darstellenden Kurve zu entnehmen ist.

Das Verhalten der Uransalze zweibasischer Phosphorsäuren gegen Indicatoren.

Von

Emil Starkenstein.

(Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 28. März 1911.)

In früher mitgeteilten Untersuchungen „über die biologische Bedeutung der Inositphosphorsäure“[1]) habe ich auch deren Verhalten bei der Urantitration geprüft und gefunden, daß diese nur den halben Wert der wirklich vorhandenen Phosphorsäure angibt. Da einem Molekül der Inositphosphorsäure 3 Moleküle P_2O_5 entsprechen, also gleich 3 Pyro- oder 6 Orthophosphorsäuren, so mußte auf Grund dieser analytischen Befunde angenommen werden, daß ein UO_2 je ein H zweier Phosphorsäuremoleküle ersetzt, daß also von den zwei freien OH-Gruppen eines Phosphorsäuremoleküls nur eine reaktionsfähig erscheint.

Bei weiteren Untersuchungen über Ionenwirkung der Phosphorsauerstoffverbindungen, die in der folgenden Arbeit mitgeteilt werden, habe ich auch andere zweibasische Phosphorsäuren in ihrem Verhalten zur Urantitration untersucht und dabei in dieser Richtung gewisse Unterschiede zwischen den zwei- und dreibasischen Phosphorsäuren gefunden, die im folgenden erörtert seien.

Die Urantitration der Orthophosphorsäure besteht bekanntlich darin, daß die Phosphorsäure in essigsaurer Lösung in der Wärme als Uranylphosphat gefällt wird.

$$Na_2HPO_4 + (UO_2)(CH_3COO)_2 = (UO_2)HPO_4 + 2CH_3COONa.$$

Als Indicator kann Ferrocyankalium oder Cochenille verwendet werden. Uranacetat reagiert mit Ferrocyankalium unter

[1]) Starkenstein, diese Zeitschr. 30, 56, 1910.

Bildung eines braunen, mit Cochenille unter Bildung eines grünen Uransalzes.

Der Gehalt der Lösung an freier Essigsäure darf kein großer sein, da sonst die Titration mit den beiden Indicatoren zu verschiedenen Resultaten führt; denn wenn man zwei gleichen Mengen destillierten Wassers die gleiche Menge Cochenille zusetzt, der einen Probe außerdem freie Essigsäure, so beobachtet man, daß in der Probe, die freie Essigsäure enthält, mehr Uranacetat notwendig ist, um den Farbenumschlag herbeizuführen, als in der Kontrollprobe, wo dies durch den ersten Tropfen der Uranacetatlösung geschieht. Dies hat seine Ursache darin, daß die freie Essigsäure eine Änderung des Dissoziationsgrades des Uranacetats bedingt. Veranlaßt wird dies dadurch, daß eine Verteilung der beiden Säuren, Essigsäure und Cochenille gegenüber dem Uranoxyd eintritt. Für die nun eintretende Reaktion zwischen Säure und Uranoxyd ist die Stärke der betreffenden Säure maßgebend. Ferner kommt hier als weitere Komplikation noch der Umstand hinzu, daß Cochenille mit Uran ein komplexes oder sehr wenig dissoziiertes Salz bildet. Doch ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetze jedenfalls die Folgerung, daß eine Vermehrung der Konzentration der Essigsäure oder einer anderen Säure, die Konzentration der Urancochenilleverbindung vermindert, und es wird daher eine größere Menge des Uransalzes notwendig sein, um den mit der Bildung des Urancochenillesalzes verbundenen Farbenumschlag sichtbar zu machen.

Dieses Moment muß bei der Titration der Orthophosphorsäure berücksichtigt werden und gewinnt eine besondere Bedeutung bei der Titration zweibasischer Phosphorsäuren. Die Verhältnisse der Urantitration zweibasicher Phosphorsäuren wollen wir zunächst an dem Beispiel der Glycerinphosphorsäure kennen lernen.

Vor allem ist hier zu berücksichtigen, daß die Glycerinphosphorsäure nicht wie die Orthophosphate mit dem Uran unlösliche Salze bildet; daß aber doch Uran gebunden wird, erkennt man leicht bei Zusatz eines Indicators (Cochenille) zur Lösung der Glycerinphosphorsäure.

Titriert man nun dieselbe Lösung unter Verwendung von Ferrocyankalium als Indicator, so bemerkt man, daß schon die ersten Tropfen des Uranacetats eine Braunfärbung des Ferrocyankaliums bedingen.

Während also bei Titration der Orthophosphate mit Uranacetat sowohl Ferrocyankalium als Cochenille in gleicher Weise verwendet werden können, besteht zwischen beiden bei der Urantitration der zweibasischen Glycerinphosphorsäure ein prinzipieller Unterschied, der durch die Unlöslichkeit des Uransalzes der Ferrocyanwasserstoffsäure sowie durch die verschiedenen Dissoziationskonstanten der beiden Indicatoren bedingt ist; für das letztere Moment ist die Gegenwart freier Essigsäure von Bedeutung. Daß dies hier mit in Frage kommt, zeigt der Unterschied, der zwischen der Titration freier Glycerinphosphorsäure und der des glycerinphosphorsauren Natrons besteht.

Den Grund für dieses eigenartige Verhalten glaube ich in folgendem zu finden:

Bei der Titration der Orthophosphorsäure treten Uranacetat, Orthophosphorsäure und Ferrocyankalium bzw. Cochenille in Reaktion. Unter den drei Säuren: Orthophosphorsäure, Cochenille (Carminsäure) und Ferrocyanwasserstoffsäure ist die Orthophosphorsäure die stärkste, sie ist auch imstande, Essigsäure aus dem Uranacetat zu verdrängen und geht mit dem Uranoxyd eine unlösliche Verbindung ein. Erst nach vollständiger Neutralisation derselben kommt es zur Salzbildung zwischen dem Ferrocyankalium bzw. Cochenille einerseits und dem Uran anderseits, und in dem Moment erfolgt auch der Farbenumschlag des Indicators.

Anders jedoch liegen die Verhältnisse bei der zweibasischen Glycerinphosphorsäure. Diese ist wohl eine stärkere Säure als Cochenille und verhält sich daher auch bei der Urantitration unter Anwendung von Cochenille als Indicator wie eine dreibasische. Man ist daher auch imstande, Glycerinphosphorsäure ebenso wie ihr Natronsalz auf diese Weise titrimetrisch zu bestimmen.

Als Beweis dafür diene folgender Beleg:

Glycerinphosphorsaures Natron entspricht der Formel:

$$C_3H_7PO_6Na_2 + 7H_2O.$$

Das Salz enthält somit 20,76 % P_2O_5. Das zu den folgenden Bestimmungen verwendete Salz entsprach vollkommen dieser Zusammensetzung, wie die folgenden Analysen zeigen:

			Gefunden %	Berechnet %
I.	0,6446 g enthalten	0,1315 g P_2O_5	20,40	20,76
II.	0,5592 g „	0,1159 g P_2O_5	20,72	

3,1945 g werden in 50 ccm H_2O gelöst.

5 ccm der Lösung mit Uranacetat titriert ergeben bei Anwendung von Cochenille als Indicator:

0,0662 g P_2O_5 (berechnet 0,0663 g P_2O_5).

Bei Anwendung von Ferrocyankalium als Indicator kommt man jedoch zu ganz anderen Resultaten:

Titriert man freie Glycerinphosphorsäure mit Uranacetat unter Anwendung von Ferrocyankalium als Indicator, so bemerkt man, daß bereits die ersten Tropfen der Uranacetatlösung den Farbenumschlag hervorrufen; es kommt also früher zur Bildung des Uransalzes der Ferrocyanwasserstoffsäure als der Glycerinphosphorsäure, und dies ist durch das Auftreten freier Essigsäure bedingt.

Glycerinphosphorsäure an sich ist wohl imstande, wie wir früher gesehen haben, Essigsäure aus ihrem Uransalze zu verdrängen und mit dem Uranoxyd eine Verbindung einzugehen. Dabei wird aber Essigsäure frei, und diese bedingt wiederum eine Änderung der Dissoziationsverhältnisse.

Während das Uransalz der Glycerinphosphorsäure löslich ist, ist dies beim Uransalz der Ferrocyanwasserstoffsäure nicht der Fall und infolge der Tendenz der Körper, schwerer lösliche Verbindungen einzugehen, erfolgt auch hier die Ausscheidung unlöslichen Ferrocyanurans.

Daß dabei auch das Auftreten freier Essigsäure von Bedeutung ist, zeigt die Titration des glycerinphosphorsauren Natrons unter sonst gleichen Bedingungen.

Bei der Bildung des glycerinphosphorsauren Uranoxyds wird Na frei, das die gleichzeitig frei werdende Essigsäure neutralisiert, und solange dies der Fall ist, bleibt auch die Verbindung des glycerinphosphorsauren Uranoxyds beständig. Setzt man aber der Lösung freie Essigsäure zu, so erfolgt sofort die Bildung des braunen Ferrocyanurans.

Aus diesem unterschiedlichen Verhalten der Glycerinphosphorsäure gegenüber den beiden Indicatoren Cochenille und Ferrocyankalium geht zunächst her-

vor, daß die zwei bei der Salzbildung ersetzbaren H-Valenzen denen einer schwächeren Säure entsprechen als die beiden bei der Orthophosphorsäure in Reaktion tretenden.

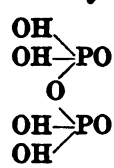
Dieses Verhalten der Glycerinphosphorsäure mußte nun auch dazu anregen, die Dissoziationsverhältnisse anderer Phosphorsäuren zu analysieren.

Zunächst wurde dies bei der Pyrophosphorsäure durchgeführt.

Titriert man Pyrophosphorsäure oder ihr Na-Salz mit Uranacetat, so entsteht schon in der Kälte, ebenso wie bei den Orthophosphaten, ein grüngelber Niederschlag.

Verwendet man Cochenille als Indicator, so kann man die Titration zu Ende führen und erhält auch den berechneten Wert an P_2O_5.

Verwendet man aber Ferrocyankalium als Indicator, so erhält man nur die Hälfte des berechneten Phosphorsäurewertes. Wir finden also hier dieselben Verhältnisse, wie ich sie in den Untersuchungen über die Inositphosphorsäure mitgeteilt habe. Nach dem Formelbilde für die Pyrophosphorsäure



und den eben mitgeteilten analytischen Befunden ergibt sich der Schluß, daß zwei H-Atome denen der Orthophosphorsäure entsprechen, da sie imstande sind, ein Uransalz zu bilden, das auch bei Gegenwart von freier Essigsäure und von Ferrocyankalium als Indicator beständig ist, während die beiden anderen H-Atome denen einer zweibasischen Phosphorsäure gleichkommen; denn auch diese bilden ein Uransalz, das aber nur gegenüber Essigsäure und Cochenille, nicht aber gegenüber Ferrocyankalium und Essigsäure beständig ist.

Diese Eigenschaften der Pyrophosphorsäure lassen wieder an deren Beziehungen zur Inositphosphorsäure denken. Bei den früher mitgeteilten Untersuchungen über das chemische Verhalten dieser Verbindung haben folgende Momente zu der Annahme geführt, daß die Phosphorsäure in der genannten Verbindung als Pyrophosphorsäure vorhanden ist: Die Verbindung

geht mit Pb, UO_2, Mg, Ca usw. Verbindungen ein, nicht aber mit Molybdänsalpetersäure, wenigstens unter den für die Orthophosphorsäure gegebenen Voraussetzungen.

Sie gibt ferner ein weißes Silbersalz und zerfällt als Natron- oder Calciumsalz bei 110° getrocknet bereits in Inosit und Orthophosphorsäure. Da nach der von Posternak für die Inositphosphorsäure (Phytin) mitgeteilten Summenformel die Existenz eines Orthophosphorsäureesters unmöglich erscheint, so habe ich in der erwähnten Mitteilung die Vermutung ausgesprochen, daß namentlich mit Rücksicht auf die angegebenen analytischen Befunde, möglicherweise eine komplexe Verbindung von Inosit und Pyrophosphorsäure vorliegt. Contardi[1]) hat wohl die Synthese der Inositphosphorsäure aus Inosit und Phosphorsäure versucht und kam zu einem Körper, der die Eigenschaften der Inositphosphorsäure aufwies, der aber einer wasserärmeren Verbindung entspricht, als sie die Summenformel Posternaks angibt. Weitere genaue Analysen müssen nunmehr entscheiden, welche von den beiden Formeln die richtige ist. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Differenzen dadurch bedingt sind, daß in dem einen Falle ein nicht wasserfreies Präparat getrocknet wurde, und daß dabei bereits, wie ich es schon früher mitgeteilt habe, eine Aufspaltung der Verbindung erfolgte. Jedenfalls entspricht die von Contardi mitgeteilte Summenformel der eines echten Inositphosphorsäureesters und würde daher auch den analytischen Befunden gerecht werden, da ja auch in dieser Verbindung die Phosphorsäure in zweibasischer Form vorhanden wäre. Anderseits ist aber das Verhalten der Inositphosphorsäure gegenüber Cochenille und Ferrocyankalium in Erwägung zu ziehen.

Wie eingangs erwähnt, war der bei der Untersuchung der Inositphosphorsäure erhobene Befund, daß die Urantitration nur die Hälfte des vorhandenen Phosphorsäurewertes angibt, der Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen.

Nun wurden früher aber die Bestimmungen stets nur unter Anwendung von Ferrocyankalium als Indicator durchgeführt und nach den nunmehr gewonnenen Erfahrungen war auch das Verhalten der Verbindung gegenüber Cochenille zu prüfen. Dabei

[1]) Contardi, Atti della R. Accad. dei Lincei 18, Heft 2, S. 64 und 19, Heft 1, S. 23.

stellte sich heraus, daß es unter diesen Bedingungen gelingt, den vollen Phosphorsäurewert der Inositphosphorsäure titrimetrisch zu ermitteln, was bekanntlich bei Anwendung von Ferrocyankalium als Indicator niemals gelingt. Es liegt also auch in dieser Beziehung eine vollkommene Übereinstimmung zwischen der Inositphosphorsäure und der Pyrophosphorsäure vor; denn wenn es sich um einen Ester der Phosphorsäure handeln würde, der nach Art des Glycerinphosphorsäureesters entstanden ist, dürften wir wohl auch ein dieser Verbindung entsprechendes analytisches Verhalten erwarten, was aber nicht der Fall ist. Allerdings kann dafür auch die Veresterung mit dem aromatischen Kern von Bedeutung sein. Jedenfalls wird es noch weiterer analytischer Daten bedürfen, um die Frage einer definitiven Entscheidung zuzuführen.

Schließlich sei noch das Verhalten der einbasischen Metaphosphorsäure bei der Urantitration erwähnt. Die Formel der Metaphosphorsäure: HPO_3 zeigt schon, daß die Bildung eines Uransalzes dieser Säure nur so zustande kommen könnte, daß zwei Moleküle zusammentreten.

Titriert man diese Säure mit Uranacetat und Cochenille als Indicator, so beobachtet man, wie bei der Titration der Glycerinphosphorsäure, daß wohl kein Niederschlag entsteht; daß aber doch Uran gebunden wird, erkennt man an dem Nichteintritt eines Farbenumschlags.

Ich habe nun eine bestimmte Menge einer Lösung von Metaphosphorsäure durch Kochen mit Salpetersäure in Orthophosphorsäure verwandelt und nach erfolgter Neutralisation den Phosphatgehalt titrimetrisch bestimmt.

Dann habe ich die gleiche Menge der Metaphosphorsäurelösung direkt mit Uranacetat titriert unter Anwendung von Cochenille als Indicator. Die Titration ergab den halben Wert der tatsächlich vorhandenen Phosphorsäure, ein Beweis dafür, daß die Salzbildung folgendermaßen erfolgt:

$$2HPO_3 + (CH_3COO)_2UO_2 = (PO_3)_2UO_2 + 2CH_3COOH.$$

Die Urantitration der Metaphosphorsäure unter Anwendung von Ferrocyankalium als Indicator ist ebenso wie bei der Glycerinphosphorsäure unmöglich, da das metaphosphorsaure Uransalz löslich, das der Ferrocyanwasserstoffsäure aber un-

löslich ist. Dieses letztere wird daher früher gebildet als das der Metaphosphorsäure.

Zusammenfassung.

Bei der Urantitration der Orthophosphate werden sowohl bei Anwendung von Cochenille als auch von Ferrocyankalium als Indicator dieselben Resultate erhalten, doch ist bei der Verwendung von Cochenille ein Überschuß an freier Essigsäure zu vermeiden, da sonst die Titration fehlerhafte Resultate ergibt.

Die Urantitration der zweibasischen Glycerinphosphorsäure kann unter Verwendung von Cochenille als Indicator ausgeführt werden. Bei Verwendung von Ferrocyankalium ist die Titration jedoch unmöglich, da das unlösliche Uransalz der Ferrocyanwasserstoffsäure früher entsteht als das lösliche der Glycerinphosphorsäure, somit auch der Farbenumschlag zu früh eintritt.

Das beweist auch, daß die zwei durch UO_2 ersetzbaren H-Valenzen bei der Glycerinphosphorsäure einer schwächeren Säure entsprechen als bei der Orthophosphorsäure.

Die Urantitration der Pyrophosphorsäure ergibt bei Verwendung von Cochenille als Indicator den berechneten P_2O_5-Gehalt, bei Verwendung von Ferrocyankalium jedoch nur die Hälfte desselben. Von den vier durch UO_2 ersetzbaren H-Valenzen entsprechen zwei an Stärke denen der Orthophosphorsäure, und diese bilden auch ein unlösliches Uransalz. Die anderen zwei jedoch kommen an Stärke denen der Glycerinphosphorsäure gleich und sind daher bei Verwendung von Ferrocyankalium als Indicator nicht titrierbar.

Das gleiche Verhalten zeigt die Inositphosphorsäure. Auch bei dieser ergibt die Urantitration aus den eben angeführten Gründen bei Verwendung von Cochenille den ganzen, bei Verwendung von Ferrocyankalium den halben Wert des berechneten P_2O_5-Gehaltes.

Metaphosphorsäure bildet unter Zusammentritt zweier Moleküle mit Uran ein lösliches Salz. Die Urantitration unter Verwendung von Cochenille als Indicator ergibt daher nur den halben berechneten Wert an P_2O_5, die Verwendung von Ferrocyankalium macht die Titration aus den gleichen Gründen wie bei der Glycerinphosphorsäure unmöglich.

Ionenwirkung der Phosphorsäuren.

Von

Emil Starkenstein.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 28. März 1911.)

I.

Die Beobachtung, daß durch intravenöse Injektion von Inositphosphorsäure und deren Salzen schwere Vergiftungserscheinungen hervorgerufen werden, hatte mich bei früheren Untersuchungen,[1]) unterstützt durch gewisse analytische Befunde, zur Annahme geführt, daß die Phosphorsäure in der genannten Verbindung als Pyrophosphorsäure vorhanden ist und nicht als Orthophosphorsäure, da deren Salze im allgemeinen als ungiftig gelten, die der Pyro- und Metaphosphorsäure dagegen als Gifte angesehen werden.

Die Erfahrungen, die man über die Wirkung dieser Stoffe hat, sind recht geringe; die Erklärungen der unterschiedlichen Giftwirkung der phosphorsauren Salze sind in einer Weise gedeutet worden, die mit unseren heutigen Anschauungen nicht mehr vereinbar sind. Zweck folgender Untersuchungen war es daher, die einzelnen Phasen in der Giftwirkung phosphorsaurer Salze genauer zu studieren und die Ursache dieser Giftwirkung kennen zu lernen.

---

[1]) Starkenstein, Die biologische Bedeutung der Inositphosphorsäure. Diese Zeitschr. 30, 56, 1910.

Die wenigen Angaben, die über die verschiedenartige Giftwirkung der Phosphorsauerstoffverbindungen zu finden sind, basieren auf den Untersuchungen von Gamgee, Priestley und Larmuth[1]) sowie auf den Arbeiten von Schulz[2]).

Die erstgenannten Autoren fanden, daß sich die Phosphorsauerstoffverbindungen ähnlich verhalten, wie die des Vanadiums. „Die orthophosphorsauren Salze sind bekanntlich ohne toxische Wirkung, dagegen haben meta- und pyrophosphorsaure Salze, besonders aber die letzteren, subcutan oder intravenös eingeführt, ausgesprochen giftige Eigenschaften, ähnlich denjenigen der entsprechenden Vanadiumverbindungen.

Pyrophosphorsaures Natrium wirkt nicht vom Magen aus, wahrscheinlich wegen zu schneller Elimination desselben. Die Annahme eines Übergangs in Orthosalze kann dieses Verhalten nicht erklären; denn weder die Fermente des Speichels, noch die des Magensaftes oder des Pankreas sind imstande, diesen Übergang zu bewirken."

Die Resultate der Untersuchungen von Schulz und dessen Erklärungsversuche waren folgende:

Die einzelnen Glieder der Stickstoffgruppe N, P, As, Sb, Bi, Va wirken sämtliche durch eine energische Steigerung des O-Umsatzes auf die Zellen. Unterphosphorige Säure (H_3PO_2), phosphorige Säure (H_3PO_3), Unterphosphorsäure (H_2PO_3), Meta- (HPO_3), Pyro- ($H_4P_2O_7$) und Orthophosphorsäure (H_3PO_4) wurden als Natriumsalze in Untersuchung gezogen. Davon sind nur jene zwei ungiftig, die den Sauerstoff in gerader Anzahl an sich tragen. Die eine, die Orthophosphorsäure, ist gesättigt und fixiert, die andere, die unterphosphorige, sättigt sich schnell durch Zutritt von O_2. Bei allen anderen muß behufs Übergang in die unwirksame Verbindung H_3PO_4 Sauerstoff in atomistischer Form disponibel gemacht werden. Dabei denkt der Autor bei der Phosphorsäure an eine partielle Umsetzung in Unterphosphorsäure: $H_4P_2O_7 = 2H_2PO_3 + O$, bei der Metaphosphorsäure an eine teilweise Bildung von phosphoriger Säure: $HPO_3 + H_2O = H_3PO_3 + O$.

Um es gleich vorweg zu nehmen, sei erwähnt, daß sich die Giftigkeit der phosphorigen Säure nicht bestätigte. [Die Vergiftungserscheinungen beruhten bei den Versuchen von Schulz auf Verunreinigungen durch Arsenik.[3])]

Auch die Wirkung der unterphosphorigen Säure kann nicht der von Schulz gegebenen Erklärung entsprechen, da später

---

[1]) Gamgee, Priestley und Larmuth, On the difference in the poisons activity of phosphorus in ortho-, meta- and pyrophosphoric acids. Journ. of anat. and phys. 11, 225, 1877. Malys J. T. Bd. VII.

[2]) Schulz, Über die Giftigkeit der Phosphorsauerstoffverbindungen und über den Chemismus der Wirkung unorganischer Gifte. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 18, 176, 1884.

[3]) Schulz, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 23, 150, 1887.

Vermeulen[1]) nachgewiesen hat, daß das Natriumhypophosphit unverändert ausgeschieden wird.

Von den übrigen Phosphorsauerstoffverbindungen erregen nun die drei Phosphorsäuren das größte Interesse.

Pyro- und Metaphosphorsäure sind kondensierte Säuren, und es fragt sich zunächst, in welcher Weise der Austritt von Wasser aus dem Molekül der Orthophosphorsäure die erhöhte Giftigkeit bedingt.

Was die Giftigkeit der Pyrophosphorsäure — mit dieser wollen wir uns zunächst beschäftigen — im allgemeinen anlangt, so fand Schulz, daß 0,5 g des Natronsalzes, Kaninchen subcutan injiziert, binnen 12 Stunden töten, 1 g führt den Tod des Versuchstieres nach 3 Stunden herbei.

Diese Dosen scheinen, wie mich meine jetzigen Versuche lehren, zu niedrig bemessen. Man beobachtet nach Injektion des Natriumsalzes, daß die Tiere sofort nach der Injektion schreien; ist die Menge der injizierten Säure genügend groß, so gehen die Tiere unter nervösen Vergiftungserscheinungen zugrunde. Die Giftigkeit der pyrophosphorsauren Salze bei intravenöser Injektion ist dagegen eine außerordentlich starke.

Injiziert man einem Kaninchen von einer 5%igen Lösung von pyrophosphorsaurem Natron ganz langsam einige Kubikzentimeter, so beobachtet man erst beschleunigte Atmung, dann gesteigerte Reflexe, Verlangsamung des Herzschlags, dann Atemstillstand, Krämpfe, Spreizen der Zehen. Das Tier kann sich noch erholen, neuerliche Injektion ruft die gleichen Erscheinungen in gesteigertem Maße hervor und diesen erliegt dann das Tier meistens.

Es ist zunächst auffallend, daß der Austritt von Wasser aus der angeblich vollkommen ungiftigen Orthophosphorsäure zur Bildung einer derart giftigen Substanz führen sollte.

Daß man nicht rundweg 1 g Pyrophosphorsäure mit 1 g Orthophosphorsäure hinsichtlich ihrer Wirkung vergleichen kann, ist naheliegend, fand aber bei den früher erwähnten Versuchen keine Berücksichtigung. Mag die Wirkung der Substanz im Anion oder im Kation des Salzes gelegen sein, auf jeden Fall sind beide im Molekül des pyrophosphorsauren Salzes gegen-

[1]) Vermeulen, Die Unveränderlichkeit des Natriumhypophosphits im Tierkörper. Diss. Amsterdam 1888. Malys J. T. 14./249.

über dem orthophosphorsauren vermehrt und müssen demgemäß berücksichtigt werden.

Um daher das pyrophosphorsaure Natron mit dem angeblich ungiftigen orthophosphorsaurem vergleichen zu können, war es nötig, von diesem auch die entsprechend gleiche Menge und in gleicher Konzentration zu injizieren und dabei zeigte sich, daß es gelingt, mit ca. 10 ccm einer 14%igen Lösung des Dinatriumphosphats (12 Moleküle H_2O!) die gleichen Vergiftungssymptome hervorzurufen wie mit 2 ccm der 5%igen Lösung des pyrophosphorsauren Salzes. Das Orthophosphat erwies sich also quantitativ als weniger giftig, qualitativ aber als gleich giftig dem Pyrophosphat.

Daß die intravenöse Injektion größerer Mengen orthophosphorsauren Natriums zu Vergiftungserscheinungen führen kann, hat schon Kobert[1]) beobachtet. Kobert deutet diese Erscheinungen als Salzwirkung.

Da also Ortho- und Pyrophosphate die gleichen Erscheinungen hervorrufen, ist anzunehmen, daß auch bei beiden Substanzen die gleiche Ursache der Giftwirkung vorliegt, bei der Pyrophosphorsäure jedoch entsprechend der quantitativ größeren Giftigkeit in ausgesprochenerem Maße.

Als Ursachen für die Giftwirkung war zunächst die alkalische Reaktion anzusehen, da das pyrophosphorsaure Natrium bedeutend alkalischer reagiert als das Dinatriumphosphat und anderseits die beobachteten nervösen Vergiftungssymptome in gleicher Weise als Ausdruck der „Alkaliwirkung" beobachtet werden können.

Schon Blake hat die stärkere Dissoziation der Pyrophosphate und die dadurch bedingte stärkere Alkaliwirkung als die Ursache der stärkeren Giftwirkung angesehen, doch ist man später von diesem Erklärungsversuch abgekommen und nahm als Grund dieser Wirkung einen eigentlichen Einfluß des Anions an.[2])

Um den Grad der Alkaliwirkung beim pyrophosphorsauren Natrium gegenüber dem orthophosphorsauren genau beurteilen zu können, war vor allem das Studium der Dissoziationsverhältnisse der Phosphorsäuren notwendig.

---

[1]) R. Kobert, Schmidts Jahrb. 179, 225, 1878.

[2]) Vgl. Spiegel, Einführung in die Pharmakologie, S. 25. München 1911.

Von der Orthophosphorsäure wissen wir, daß sie wohl drei Reihen von Salzen bilden kann, daß dabei jedoch deren stufenförmige Dissoziation in Betracht gezogen werden muß.

Die Orthophosphorsäure ist eine dreibasische Säure, die sich aber wie eine zweibasische verhält. Ihr erstes $H^{\cdot}$ dissoziiert leicht, das zweite schwerer, das dritte fast gar nicht.

H_3PO_4 dissoziiert folglich leicht in $H^{\cdot} + H_2PO_4'$. H_2PO_4' verhält sich wie eine schwächere Säure und dissoziiert in $H^{\cdot} + HPO_4''$. HPO_4'' schließlich dissoziiert kaum mehr in $H^{\cdot} + PO_4'''$, entspricht also einer außerordentlich schwachen Säure.

Diese Verhältnisse kommen nun bei der Bildung der drei möglichen Natronsalze der Orthophosphorsäure zum Ausdruck.

Das primäre Na-Salz NaH_2PO_4 reagiert in Lösung schwach sauer, da es zunächst in $Na^{\cdot}$ und H_2PO_4' dissoziiert, H_2PO_4' aber in $H^{\cdot}$ und HPO_4''', so daß freie H-Ionen auftreten.

Die Lösung des sekundären Natriumphosphats dagegen reagiert schwach alkalisch; denn Na_2HPO_4 dissoziiert im $Na + Na$ und HPO_4. HPO_4 ist jedoch schon sehr wenig dissoziiert, zum Teil schon weniger als das Wasser und die Folge davon ist die hydrolytische Spaltung: $HPO_4 + H_2O = H_2PO_4 + OH$. Das Auftreten freier OH-Ionen bedingt bereits die alkalische Reaktion. Noch ausgesprochener ist dies beim tertiären Natriumphosphat der Fall. Von dem Salze Na_3PO_4 existiert in wässeriger Lösung außer dem Natriumion nicht das dreiwertige Ion PO_4''', sondern an seiner Stelle das zweiwertige Ion HPO_4'' und OH als Folge der hydrolytischen Spaltung. Die elektrolytische und hydrolytische Dissoziation der beiden alkalischen Natronphosphate verläuft also folgender Reaktionsgleichung entsprechend:

$$Na_2HPO_4 + H_2O = NaH_2PO_4 + NaOH$$
$$Na_3PO_4 + 2H_2O = NaH_2PO_4 + 2NaOH.$$

Bei Verwendung dieser Salze für physiologische Versuche wird daher der zunehmende Alkaligehalt der Lösungen berücksichtigt werden müssen.

Die stufenförmige Dissoziation der Orthophosphorsäure kommt auch in ihrem Verhalten zu den Indicatoren zum Ausdruck. Bei der Orthophosphorsäure entspricht nur das erste H-Atom dem einer starken Säure. Das zweite H entspricht einer Säure, die bereits schwächer dissoziiert ist als Methylorange. Es werden daher in jenem Momente die gelben Ionen des Indicators an Stelle der roten undissoziierten Moleküle treten, wenn das erste H durch Na ersetzt ist.

Bei Verwendung von Phenolphthalein gestalten sich die Verhältnisse anders.

Phenolphthalein ist eine stärkere Säure als jene, der das dritte H-Atom der Phosphorsäure entspricht, aber eine schwächere Säure als Methylorange. Die roten Ionen dieses Indicators treten daher erst dann an Stelle der farblosen, undissoziierten Moleküle, wenn auch das zweite H durch Na ersetzt ist.

Nach diesen Erfahrungen war es möglich, auch die Dissoziationsverhältnisse bei der Pyrophosphorsäure zu studieren und so Aufschluß über den Säuregrad der einzelnen Valenzen zu erhalten.

Hierzu war zunächst erforderlich, den Gehalt einer Lösung an freier Phosphorsäure zu prüfen, dann die Salzbildung bei Verwendung verschiedener Indicatoren zu studieren.

Die freie Pyrophosphorsäure stellte ich mir aus dem Dinatriumphosphat dar, um nicht auch freie Metaphosphorsäure in die Lösung zu bekommen, was beim Erhitzen der Phosphorsäure auf 213° stets der Fall ist.

Das Dinatriumphosphat wurde erst in einer Porzellanschale über freier Flamme vom Krystallwasser befreit, dann in einem Platintiegel über dem Gebläse so lange erhitzt, bis aus der homogenen geschmolzenen Flüssigkeit keine Gasblasen mehr aufstiegen. Die erkaltete Masse wurde dann in Wasser gelöst, mit neutralem Bleiacetat gefällt, das pyrophosphorsaure Blei mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die verdünnte Lösung von freier Pyrophosphorsäure abfiltriert.

Die Bestimmung der Pyrophosphorsäure kann dann derart erfolgen, daß man sie durch Kochen mit Säuren in Orthophosphorsäure überführt und deren Gehalt dann durch eine der bekannten Methoden ermittelt.

Ich habe bei dieser Gelegenheit auch das direkte Verhalten der Pyrophosphorsäuren bei der Urantitration geprüft und bin dabei zu den in der vorhergehenden Mitteilung[1]) angeführten Resultaten gekommen.

Um nun über die Dissoziationsverhältnisse bei der Pyrophosphorsäure Aufschluß zu erhalten, habe ich nach erfolgter Überführung der Pyrophosphorsäure in Orthophosphorsäure deren Gehalt durch Urantitration einerseits, durch die Molybdän-Salpetersäurefällung andererseits als P_2O_5 ermittelt.

10 ccm der Lösung enthalten 0,0917 g P_2O_5. Dies entspricht 0,1149 g $H_4P_2O_7$.

Zur vollständigen Neutralisation bzw. zur Bildung des Salzes $Na_4P_2O_7$ sind 0,1033 g NaOH = 25,8 ccm $^n/_{10}$-NaOH notwendig.

10 ccm der Lösung brauchen bei Verwendung von Methylorange als Indicator 13 ccm $^n/_{10}$-NaOH zur Neutralisation; bei Verwendung von Phenolphthalein erfolgt bei ca. 23 ccm $^n/_{10}$-NaOH ein Umschlag zu Rosa;

[1]) Diese Zeitschr. 32, 235, 1911.

der Farbenton ändert sich dann auf weiteren Zusatz von Lauge nicht merklich und geht erst bei ca. 26 ccm allmählich in Rot über.

In einer zweiten Bestimmung wurde der Gehalt einer Lösung an P_2O_5 ermittelt:

20 ccm enthalten 0,0408 g P_2O_5; dementsprechend 0,0511 g $H_4P_2O_7$.

Zur Bildung des Tetranatriumpyrophosphats wären demgemäß erforderlich 0,0459 g NaOH = 11,4 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Bei der Titration dieser 20 ccm wurden gebraucht bei Verwendung von Methylorange 5,7 ccm $^n/_{10}$-NaOH; bei Verwendung von Phenolphthalein erfolgte bei 10,1 ccm der Farbenumschlag zu Rosa, bei 11,7 ccm der Übergang in Rot.

Die gegen Methylorange neutralen Lösungen reagieren sauer gegen Phenolphthalein und Lackmus; bei Eintritt der Rosafärbung der Lösung beginnt auch der Farbenumschlag gegen Lackmus. Die gegen Phenolphthalein rot reagierende Lösung reagiert stark alkalisch gegen Lackmus.

Aus diesen Titrationsresultaten geht nun hervor, daß der Neutralisationspunkt gegen Methylorange dann eintritt, wenn die beiden stärker dissoziierten H-Atome durch Na ersetzt sind. Bei Besetzung des dritten H erfolgt der Farbenumschlag zu Rosa (bei Verwendung von Phenolphthalein als Indicator). Der weitere Farbenumschlag erfolgt allmählich, und das beweist, daß auch das vierte H noch dissoziiert ist. Der rote Farbenton tritt erst dann ein, wenn auch das vierte H-Atom durch Na besetzt ist. Eine genaue Titration des dritten und namentlich des vierten H-Atoms ist aber nicht mehr möglich, weil die Dissoziation schon eine recht geringe ist.

In guter Übereinstimmung mit diesen Befunden stehen die Zahlen für die elektrolytische Dissoziation der Pyrophosphorsäure, wie sie Abbot und Bray[1]) durch Messung der Leitfähigkeit festgestellt haben:

Pyrophosphorsäureion	$H_2P_2O_7'' + H^{\cdot}$ . .	$1{,}4 \times 10^{-1}$
„	$H_2P_2O_7'' + H^{\cdot}$ . .	$1{,}1 \times 10^{-2}$
„	$HP_2O_7''' + H^{\cdot}$ . .	$2{,}9 \times 10^{-7}$
„	$P_2O_7'''' + H^{\cdot}$ . .	$3{,}6 \times 10^{-9}$

Demnach entspricht das erste H-Atom dem einer starken Säure (nicht ganz so stark wie HCl oder HNO_3). Das Trihydropyrophosphation $H_3P_2O_7$ ist eine etwas schwächere Säure und seine Ionisationskonstante beinahe identisch mit der der

[1]) Abbot und Bray, Die Ionisationsbeziehungen von Ortho- und Pyrophosphorsäure und ihren Natronsalzen. Journ. Americ. Chem. Soc. 31, 729, 1909; Chem. Centralbl. 1909, II, 894.

Orthophosphorsäure von derselben Ionenkonzentration. Das Dihydropyrophosphation $H_2P_2O_7$ ist eine schwache Säure von beinahe derselben Stärke wie das Dihydrophosphation H_2PO_4', während das Monohydropyrophosphation HP_2O_7''' noch schwächer ist, keineswegs aber so schwach wie das Monohydrophosphation HPO_4''.

Die Messung der Dissoziationsverhältnisse der Orthophosphorsäure ergab folgende Resultate:

Orthophosphorsäureion	$H_2PO_4' + H^{\cdot}$ . .	$1{,}1 \times 10^{-2}$
„	$HPO_4'' + H^{\cdot}$ . .	$1{,}95 \times 10^{-7}$
„	$PO_4''' + H^{\cdot}$ . .	$3{,}6 \times 10^{-13}$

Orthophosphorsäure verhält sich demnach mit ihrem ersten H-Äquivalent wie eine ziemlich starke Säure, mit dem zweiten wie eine schwache Säure (zwischen CO_2 und Schwefelwasserstoffsäure). Das dritte H-Äquivalent entspricht dem einer bemerkenswert schwachen Säure zwischen den Säureradikalen HCO_3 und HS'.

Diese Befunde stehen im Einklang mit den Neutralisations- und Bildungswärmen.

Aus dem Mittelwert der Bildungswärme der Natronsalze der Orthophosphorsäure zu 49,20 Cal. und der Pyrophosphorsäure zu 54,11 Cal.[1]) ergibt sich ebenso wie aus den Resultaten, die durch Messung der Leitfähigkeit und durch die Indicatorenmethode gewonnen wurden, daß die wirkliche Acidität der Pyrophosphorsäure eine größere ist als die der Orthophosphorsäure.

Auf Grund dieser physikalisch-chemischen Daten sind für physiologische Versuche zunächst zwei Momente zu berücksichtigen: die erhöhte Alkalinität des pyrophosphorsauren Natrons und die erhöhte Acidität der freien Säure gegenüber der Orthophosphorsäure.

Was die erhöhte Alkalinität des Natronsalzes betrifft, so ist folgendes zu berücksichtigen:

Obwohl Pyrophosphorsäure besser dissoziiert ist als Orthophosphorsäure, so ist dies doch nicht so weit der Fall, daß es nicht neben der elektrolytischen Spaltung auch zur hydrolytischen käme. Wir sahen oben, daß elektrolytische und

[1]) H. Giran, Über die Acidität der Pyrophosphorsäure. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 134, 1499; Chem. Centralbl. 1902, II, 330.

hydrolytische Spaltung der Orthophosphate nach folgenden Reaktionsgleichungen verlaufen:

$$Na_2HPO_4 + H_2O = NaH_2PO_4 + NaOH,$$
$$Na_3PO_4 + 2H_2O = NaH_2PO_4 + 2NaOH.$$

Analog dieser Dissoziation stünde zu erwarten, daß pyrophosphorsaures Natron sich folgendermaßen verhalte:

$$Na_4P_2O_7 + 3H_2O = NaH_3P_2O_7 + 3NaOH.$$

Nun haben wir aber gesehen, daß das erste H-Atom der Pyrophosphorsäure leichter abdissoziiert als das erste der Orthophosphorsäure, dieses vielmehr dem zweiten H-Atom der Pyrophosphorsäure entspricht, und es steht daher zu erwarten, daß elektrolytische und hydrolytische Dissoziation folgender Reaktionsgleichung entsprechen:

$$Na_4P_2O_7 + 2H_2O = Na_2H_2P_2O_7 + 2NaOH.$$

Auf jeden Fall müssen wir bei Berücksichtigung gleicher Konzentrationsverhältnisse bei dem Tetranatriumpyrophosphat einen Gehalt an freien OH-Ionen — also einen Alkaligehalt — annehmen, der mindestens dem des tertiären Natriumphosphats entspricht.

Diese beiden Salze werden somit auch in Vergleich gezogen werden müssen, wenn man die unterschiedliche Giftwirkung phosphorsaurer Salze hinsichtlich des Kations prüfen will. Um aber auf jeden Fall auch die Menge des Anions zu berücksichtigen, nahm ich den P_2O_5-Gehalt der einzelnen Salze als Vergleichspunkt an. Da 1 Molekül Pyrophosphorsäure 1 P_2O_5 entspricht, 1 Molekül der Orthophosphorsäure aber nur $^1/_2$ P_2O_5, so wurden zu den Versuchen solche Lösungen verwendet, die 5,32 g Pyrophosphat in 100 ccm H_2O enthielten $= \frac{N}{5}$, und dementsprechend bei Prüfung der Orthophosphate solche, die in gleichem Verhältnis die bimolekulare Menge in der entsprechenden Konzentration gelöst enthielten. Daraus ergaben sich unter Berücksichtigung des Krystallwassergehaltes der Salze folgende Werte.

In 50 ccm Wasser gelöst, entsprechen:

2,66 g pyrophosphorsaures Natron 7,16 g Dinatriumphosphat, 7,60 g Trinatriumphosphat.

Die Wirkung dieser Lösungen zeigen folgende Versuche:

A. Kaninchen. 1910 g. Nach intravenöser Injektion von 1 ccm der Pyrophosphatlösung: Unruhe, Pulsverlangsamung, dann Erholung. Nach 2 ccm Zittern, Unruhe, Spreizen der Zehen, Krämpfe, tracheale Rasselgeräusche, zeitweiliger Atemstillstand, Verlangsamung des Herzschlags. Langsame Erholung.

B. Kaninchen. 2300 g. Nach intravenöser Injektion von 3 ccm der Dinatriumphosphatlösung leichte Unruhe des Tieres. Nach 8 ccm Unruhe, Pulsverlangsamung, tracheale Rasselgeräusche. Nach weiteren 2 ccm Unruhe, Zittern, Spreizen der Zehen, Krämpfe, Atemstillstand. Langsame Erholung.

C. Kaninchen. 2340 g. Nach intravenöser Injektion von 1,5 ccm der Trinatriumphosphatlösung beschleunigte Atmung; nach 3 ccm Unruhe des Tieres, leichte Krämpfe. Nach 5 ccm Verlangsamung des Herzschlags, Krämpfe, Spreizen der Zehen, vorübergehender Atemstillstand. Langsame Erholung.

Bei allen 3 Versuchen gelang es, durch neuerliche Injektion von ganz geringen Mengen der Lösungen nach erfolgter Erholung sofort dieselben Erscheinungen in gesteigertem Maße hervorzurufen.

Diese 3 Versuche zeigen, daß alle 3 phosphorsauren Salze dieselben Vergiftungserscheinungen hervorrufen, und daß dabei das Trinatriumphosphat auch in quantitativer Beziehung dem Pyrophosphat sehr nahe steht. Mit Rücksicht auf das früher erwähnte physikalisch-chemische Verhalten der genannten Salze ist wohl der Schluß naheliegend, daß die beobachteten Vergiftungserscheinungen wenigstens zum großen Teile der Alkaliwirkung zuzuschreiben sind, und dies schon aus dem Grunde, weil es gelingt, durch intravenöse Injektion von entsprechender Menge Natronlauge das gleiche Vergiftungsbild hervorzurufen.

Man darf natürlich nicht erwarten, daß die Quantitäten von Natronlauge, die notwendig sind, um das Vergiftungsbild auszulösen, vollkommen den aus den phosphorsauren Salzen berechneten entsprechen; denn während bei der Lauge die reine Alkaliwirkung zum Ausdruck kommt, kombiniert sich diese bei den Phosphaten noch mit der ihr ähnlichen Salzwirkung. Während die einzelnen Komponenten allein noch nicht diese Erscheinungen hervorrufen können, genügt die Vereinigung beider, um die im Wesen übereinstimmenden Symptome der Vergiftung in Erscheinung treten zu lassen.

Für die Beteiligung der Alkaliwirkung an der beschriebenen Vergiftung spricht auch folgende Beobachtung: Dieselbe Menge

NaOH, die imstande ist, nach intravenöser Injektion die erwähnten Symptome hervorzurufen, bleibt ohne Wirkung, wenn sie in verdünnter Lösung injiziert wird. Es handelt sich also hier nicht um eine spezifische Giftwirkung des Moleküls, sondern um eine Konzentrationserscheinung.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Phosphaten. Während in dem beschriebenen Versuche A 0,035 g $H_4P_2O_7$ als Na-Salz in 1 ccm Lösung genügten, um Vergiftungserscheinungen auszulösen, blieben bei einem Kaninchen von 1500 g 0,12 g $H_4P_2O_7$, als Na-Salz in 35 ccm gelöst und innerhalb 20 Minuten injiziert, ohne jede Wirkung.

Daß es sich nicht um eine spezifische Wirkung handeln kann, das beweisen die Versuche, bei denen die Substanz per os oder subcutan beigebracht wurde.

Bezüglich der Versuche mit Verfütterung per os wissen wir, daß hier deshalb Vergiftungserscheinungen nicht auftreten, weil die Pyrophosphate hier bald in Orthophosphate übergehen und als solche zur Resorption kommen; denn wenn Gamgee, wie einleitend bereits erwähnt wurde, auch annimmt, daß eine solche Überführung des Pyrophosphats in das Orthophosphat weder durch die Fermente des Speichels noch durch die des Magensaftes oder des Pankreas erfolgen könne, so wissen wir doch, daß die H-Ionenkonzentration des Magensaftes genügt, um diese Aufspaltung zu vollführen.

Die eben mitgeteilten Versuche, die uns zu dem Schlusse führen, daß als wichtige Komponente der Phosphatwirkung die Alkaliwirkung in Betracht kommt, bringen uns jene Vergiftungsbilder in Erinnerung, die durch intravenöse Injektionen von Seifenlösungen hervorgerufen wurden.

Die Giftwirkung intravenöser Seifeninjektionen wurde zuerst von Kobert und Baßmann[1]) sowie von I. Munk[2]) festgestellt. Die Ursache der Giftwirkung sehen die Autoren darin, daß die Seifen lösend auf das Lecithin und Cholesterin der Blutkörperchen und Nervenzellen wirken.

Demgegenüber hat Botazzi[3]) die Ansicht ausgesprochen, daß sich aus dem eingeführten ölsauren Natrium durch Dissoziation freies NaOH

[1]) Kobert und Baßmann, Schmidts Jahrb. 189, 3, 1881.

[2]) I. Munk, Berl. klin. Wochenschr. 1889, 180; Med. Centralbl. 27, 513, 1889; Arch. f. Anat. u. Physiol 1890, Suppl. 116; Centralbl. f. Physiol. 13, 657, 1900.

[3]) Botazzi, Lo Sperimentale 53, 1899; Malys J. T. 29, 201.

bildet, so daß die Giftwirkung als Alkaliwirkung angesehen werden müsse. Diese Ansicht Botazzis sucht Munk durch Versuche zu entkräften, in denen es ihm nicht gelang, durch die entsprechende Menge NaOH die gleichwertigen Vergiftungserscheinungen hervorzurufen. Während ferner Botazzi seine Behauptung auf Versuche von Krafft und Stern[1]) stützt, wonach wässerige Seifenlösungen in die Fettsäuren und freies NaOH gespalten werden, hebt Munk hervor, daß das neutrale ölsaure Natron schon an sich wenig dissoziabel ist.

Was nun den ersten Einwand Munks gegenüber der Anschauung Botazzis betrifft, so gilt diesbezüglich das gleiche wie bei den Phosphaten. Erstens sind die Erscheinungen der Seifenwirkung mit der Laugenwirkung konform, zweitens kommt hier eine nicht zu übersehende Salzwirkung in Betracht; beide Komponenten können gewiß auch hier schon bei gleichzeitiger Wirkung jene Phänomene auslösen, die jede einzelne an und für sich noch nicht in Erscheinung treten lassen kann.

Was den zweiten Einwand betrifft, daß das Natriumoleat nur wenig dissoziiert sei, so möchte ich diesbezüglich auf eine jüngst erschienene Arbeit Dresers[2]) verweisen. Dreser glaubt, daß die Auslösung einer leicht schmerzhaften Reizung durch Lauge auf einer chemischen Läsion der Substanz der sensiblen Nervenenden beruhe, wobei ein gewisser Teil des Alkalis chemisch verbraucht wird. Im vorliegenden Falle wird also zunächst in verdünnter Lösung die geringe elektrolytische Dissoziation der Ölsäure eine nennenswerte hydrolytische Spaltung des Salzes bedingen. Ist dann ein Teil der aktuellen OH-Ionen verbraucht, so ist das bisher vorhandene Gleichgewicht gestört, neues Natriumoleat muß nach dem Massenwirkungsgesetz dissoziieren, und dies geht so lange fort, bis alle verbrauchten aktuellen OH-Ionen durch ihre potentiellen ersetzt sind. Es können auf diese Weise alle potentiellen OH-Ionen als aktuelle in Wirkung treten; aber wie aus den erwähnten Untersuchungen Dresers hervorgeht, sind bei den hydrolysierenden Salzen die potentiellen OH-Ionen in noch stärkerem Maße beteiligt als die aktuellen, während natürlich bei der verdünnten Lauge nur die darin ausschließlich vorhandenen aktuellen OH-Ionen in Aktion treten. Allerdings zeigt Dreser gerade am Beispiel

[1]) Krafft und Stern, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 27, S. 1753.

[2]) H. Dreser, Über alkalisch reagierende Medikamente. Arch. internat. d. Pharmacodyn. et d. Therap. 20, 431, 1911.

des Sapo medicatus, daß neben der Alkaliwirkung noch andere, recht intensive mit in Frage kommen.

Zusammenfassend ergibt sich für die Frage der Beteiligung der Alkaliwirkung bei der Vergiftung durch intravenöse Seifeninjektion, daß gewiß, der Anschauung Botazzis entsprechend, die vorhandenen OH-Ionen als Hauptursache der beobachteten Erscheinungen anzusehen sind, in ähnlicher Weise, wie wir dies bei den phosphorsauren Salzen gesehen haben.

Daß auch hinsichtlich der Konzentration hier ähnliche Verhältnisse vorliegen, zeigt folgender Versuch.

Bei einem Kaninchen (1900 g) treten nach langsamer Injektion von 10 ccm einer 2%igen Lösung von Sapo medicatus Krämpfe auf, Pulsverlangsamung, Atemstillstand, Spreizen der Zehen, also dasselbe Bild, wie wir es bei den phosphorsauren Salzen und bei der reinen Alkaliwirkung beobachten können. In 2%iger Lösung dagegen bleibt die gleiche Menge ohne Wirkung.

Trotzdem wir als einen Hauptfaktor der Wirkung phosphorsaurer Salze die Alkalikomponente ansehen müssen, gelingt es nicht, durch Neutralisation der gleich konzentrierten Lösung die Giftwirkung zu paralysieren; denn die hier ebenfalls eintretende „Salzwirkung" geht mit dieser Alkaliwirkung Hand in Hand. Aus dem später zu besprechenden Beispiele der metaphosphorsauren Salze geht hervor, daß bei diesen Salzen die Salzwirkung bedeutend leichter hervorzurufen ist, als bei gleich konzentrierten Chlornatrium- oder Natriumsulfatlösungen.

Schließlich ist noch zu berücksichtigen, daß wir theoretisch neutrale Lösungen von Pyrophosphaten nur schwer herstellen können; denn während das Salz $Na_4P_2O_7$ stark alkalisch reagiert, ist das Salz $Na_2H_2P_2O_7$ schon sauer. Obwohl wir also die Wirkung der Phosphate als die der Kationen ansehen müssen, ist andererseits schwer, diese selbst wieder in ihre Komponenten zu zerlegen.

In welcher Weise die subcutane Pyrophosphatinjektion verläuft, zeigen folgende Versuche.

Ein Kaninchen von 1600 g erhielt um 8 Uhr abends 0,5 g pyrophosphorsaures Natrium subcutan, jene Menge, die nach Angaben von Schulz ein Kaninchen innnerhalb 12 Stunden tötet.

Das Tier schrie nach der Injektion, was wohl auf die stark alkalische Reaktion der Injektionsflüssigkeit zu beziehen ist, saß aber am nächsten Morgen munter im Käfig. Bloß an der Injektionsstelle bilden sich nach solchen Injektionen Abscesse aus; andere Erscheinungen konnte ich nicht beobachten.

Ein Kaninchen von 1500 g erhielt am 14. II. um 6 Uhr abends 0,26 g pyrophosphorsaures Natrium in 5 ccm H_2O gelöst subcutan.

Am nächsten Tage keine Erscheinungen. Um 6 Uhr abends neuerliche Injektion von 0,5 g pyrophosphorsaurem Natron.

Am nächsten Morgen ist das Tier munter im Käfig. Abscesse an den Injektionsstellen.

Um 12 Uhr mittags erhält das Tier 1 g pyrophosphorsaures Natron subcutan, eine Dosis, die nach Schulz innerhalb 3 Stunden tödlich wirkt. Auch am nächsten Morgen ist das Tier normal.

Außer dem Schreien des Tieres nach der Injektion und den Abscessen und Ödemen an der Injektionsstelle konnte auch bei diesem Tiere nichts beobachtet werden.

Ein Kaninchen von 1800 g erhielt um 6 Uhr abends 2 g pyrophosphorsaures Natron neutralisiert in 100 ccm subcutan injiziert. Am nächsten Morgen wird es tot vorgefunden. Bei der Sektion zeigten sich ausgedehnte blutige Suffusionen an den Injektionsstellen.

Ein Kaninchen von 1200 g erhielt 2 g pyrophosphorsaures Natron neutralisiert subcutan injiziert. Es wird bald matt, läßt den Kopf hängen, liegt wie gelähmt da. Nach ungefähr 1 Stunde treten leichte Krämpfe ein, in denen das Tier zugrunde geht.

Zwei andere Kaninchen von 1800 und 1650 g erhielten je 2 g pyrophosphorsaures Natron subcutan injiziert. Eins der Tiere ging am 3. Tage nach der Injektion zugrunde, das zweite zeigte überhaupt keine Erscheinungen.

Da der Sektionsbefund bei den durch die oben angeführten Injektionen getöteten Tiere ergeben hatte, daß an den Injektionsstellen blutige Suffusionen auftraten, so ist wohl anzunehmen, daß in diesen Fällen ein Gefäß angestochen wurde und so die subcutane Injektion unbewußt zur intravaskulären wurde. Da auf diese Weise schon 1 g tödlich wirkte, in anderen Fällen 2 g ohne Wirkung blieben, so ist wohl der Schluß gerechtfertigt, daß die subcutane Injektion von Pyrophosphat hinsichtlich ihrer Toxizität mit der intravenösen gar nicht zu vergleichen ist.

Hinsichtlich der Alkaliwirkung bei den subcutanen Injektionen von Pyrophosphat in den angegebenen Konzentrationen ist zu erwähnen, daß dadurch wohl nur schwere lokale Reizerscheinungen hervorgerufen werden, was auch das Schreien der Tiere bedingt.

Die Resultate der Untersuchungen über die Pyrophosphate lassen sich dahin zusammenfassen, daß man zunächst zum Vergleiche ihrer Wirkung mit den

Orthophosphaten sowohl die Menge des Anions als des Kations berücksichtigen muß. Annähernd, wenn auch nicht vollständig, kann man das durch äquivalente Lösungen, nicht aber durch äquimolekulare erreichen. Im Prinzip ist das Wesen der Orthophosphatwirkung das gleiche wie das der Pyrophosphatwirkung. Da jedoch die Acidität der letzteren eine größere ist als die der Orthophosphorsäure und dementsprechend auch andere Dissoziationsverhältnisse vorliegen, so kommen die Erscheinungen dort quantitativ stärker zum Ausdruck. Bei intravenöser Injektion des Tetranatriumsalzes der Pyrophosphorsäure sowie des Tri- und zum Teil des Dinatriumphosphats kommt in erster Linie eine Alkaliwirkung in Betracht. Es liegen ähnliche Verhältnisse vor, wie bei der intravenösen Injektion von Seifenlösungen. Eine scharfe Grenze zwischen Salz- und Alkaliwirkung läßt sich aber weder hier noch dort ziehen.

Bei Verabreichung der Pyrophosphate per os kommt diese Wirkung deshalb nicht zum Ausdruck, weil die H-Ionenkonzentration des Magensaftes genügt, um das Pyrophosphat in das Orthophosphat überzuführen.

Bei subcutaner Injektion zeigen erst unverhältnismäßig größere Dosen der Phosphate eine Giftwirkung, wobei die Salzwirkung in erster Linie mit in Frage kommt. Eine spezifische Wirkung des Säureanions ließ sich bei keiner Art der Injektion erkennen.

Ganz anders als die Wirkung der Ortho- und Pyrophosphate ist die der metaphosphorsauren Salze zu beurteilen.

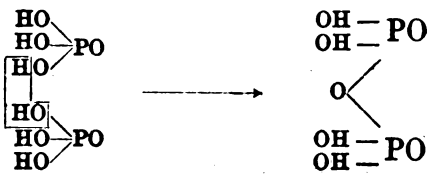
Das gewöhnliche Formelbild der Metaphosphorsäure HPO_3 würde vermuten lassen, daß wir hier ein einfacheres Gebilde vor uns haben als in der Ortho- und Pyrophosphorsäure. Dies ist aber keineswegs der Fall.

Daß wir in der Metaphosphorsäure HPO_3 kein eigentliches Analogon der Salpetersäure HNO_3 sehen dürfen, führt auch Ostwald in den „Wissenschaftlichen Grundlagen der analytischen

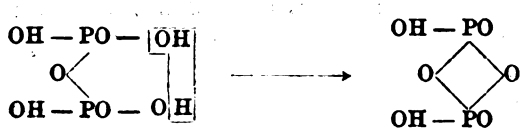
Chemie" an. „Man könnte eine solche Analogie nach den Beziehungen zwischen Stickstoff und Phosphor vermuten, doch ist die Metaphosphorsäure ebenso wie die Pyrophosphorsäure eine kondensierte Säure, der gewiß ein höheres Molargewicht zukommt, als es durch die Formel HPO_3 angezeigt wird."

Da die Größe des Molargewichtes für die physiologische Wirkung gewiß von größter Bedeutung ist, so müssen wir dies zunächst berücksichtigen und können aus der Ableitung der Metaphosphorsäure von der Ortho- bzw. Pyrophosphorsäure dafür die richtige Vorstellung gewinnen.

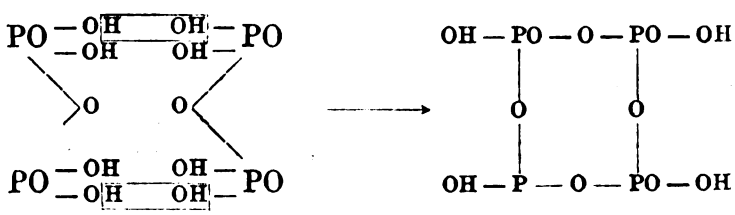
Durch Wasseraustritt aus zwei Molekülen Orthophosphorsäure entsteht die Pyrophosphorsäure



Durch Austritt eines Molekül Wasser aus dem Moleküle der Pyrophosphorsäure entsteht die Metaphosphorsäure.



Schon aus dieser Ableitung sehen wir, daß die Metaphosphorsäure polymerisiert ist und dies wird durch ihre Dampfdichte bestätigt. Nach den Untersuchungen von Tilden und Barnett kommt ihr bei höherer Temperatur die Formel $(HPO_3)_2$ zu. Dies wäre die einfachste Form. Wir können uns aber ganz gut vorstellen, daß der Austritt von Wasser ebenso wie aus der Orthophosphorsäure auch hier aus 2 Molekülen Pyrophosphorsäure erfolgt.



Auf diese Weise entstünden Körper von bedeutend höherem Molargewichte als wir nach der Formel HPO_3 annehmen müßten.

Zu den Versuchen habe ich mir das metaphosphorsaure Natrium derart hergestellt, daß ich das primäre Natriumphosphat erst in einer Porzellanschale vom Krystallwasser befreite und dann im Platintiegel über dem Gebläse so lange erhitzte, bis eine klare homogene glasige Masse resultierte, die dann langsam abgekühlt wurde. Dabei entsteht bereits neben trimetaphosphorsaurem auch etwas hexametaphosphorsaures Natron. Von derartigen polymeren Modifikationen sind eine ganze Reihe bekannt bis zu Tetrakaidekametaphosphaten.

Injiziert man einem Kaninchen eine verdünnte neutralisierte Metaphosphatlösung, so treten keine Erscheinungen auf. Nach Injektion einer konzentrierteren Lösung (2,5 bis 3%) zeigen die Tiere bereits nach 5 bis 7 ccm Unruhe, Zittern der Barthaare und der Extremitäten, Symptome, die unschwer als die einer Salzwirkung zu deuten sind. Für die Deutung einer Salzwirkung spricht auch die Tatsache, daß verdünnte Lösungen keine solche Erscheinungen hervorrufen.

Das gleiche gilt von den subcutanen Injektionen. Schulz gibt zwar an, daß 1 g Natriummetaphosphat, einem Kaninchen auf einmal injiziert, dasselbe tötet, während es dieselbe Menge in mehreren Dosen verabreicht verträgt. Wie bei den Pyrophosphaten fand ich auch hier die letale Dosis als zu niedrig bemessen. Ein Kaninchen von 2500 g bekam um 7 Uhr abends 2 g metaphosphorsaures Natron subcutan injiziert. Am nächsten Morgen saß es munter im Käfig.

Die toxische Wirkung der metaphosphorsauren Salze äußern sich also vorwiegend in der charakteristischen Salzwirkung. Zu berücksichtigen ist aber, daß bereits viel geringere Mengen als z. B. von den Salzen der Chlorwasserstoffsäure diese Wirkung haben.

Soweit überhaupt von einer Giftwirkung der phosphorsauren Salze die Rede sein kann, betrifft diese stets die Kationen. Eine spezifische Wirkung des Phosphorsäure-Anions konnte auch bei dieser Säure nicht beobachtet werden.

Es bestand weiter die Möglichkeit, daß die beobachtete Giftwirkung der Phosphorsauerstoffverbindungen durch Kalkentziehung hervorgerufen wird. Es wurden daher die geschilderten Versuche an Kaninchen wiederholt, denen vorher größere Mengen von Calciumchlorid injiziert worden waren. Das Resultat der Versuche erfuhr dadurch keine Änderung, so daß dieser Erklärungsmodus entfällt.

II.

Im Anschluß an die Erörterungen über das Wesen der Giftwirkung phosphorsaurer Salze erübrigt es noch, auch die Giftwirkung einiger Substanzen zu analysieren, in denen die Phosphorsäure an einen organischen Komplex gebunden erscheint.

Einleitend wurde hervorgehoben, daß die Giftigkeit intravenöser Injektionen von Inositphosphorsäure mit anderen Momenten als Anlaß dafür angegeben wurde, die im Phytin vorhandene Phosphorsäure für Pyrophosphorsäure zu halten. Da wir aber gesehen haben, daß die Giftigkeit phosphorsaurer Salze keine spezifische Wirkung der Pyrophosphorsäure ist, so werden wir die dort gewonnenen Erfahrungen auch hier verwerten können.

Was die Giftwirkung der intravenösen Injektionen anlangt, so erscheint es sofort begreiflich, daß wir auch hier nicht Inositphosphorsäure und Phosphorsäure in äquimolekularen Mengen vergleichen dürfen. Das Molekulargewicht des inositphosphorsauren Natriums beträgt 978, das des pyrophosphorsauren 266. Nun haben wir aber in der Inositphosphorsäure 3 Pyrophosphorsäuren oder im Falle eines echten Esters 6 Orthophosphorsäuren enthalten.

Zum Vergleiche mit dem Pyrophosphat müssen wir daher auch vom Natriumsalz der Inositphosphorsäure $^1/_6$ nehmen, also 326.

Vergleichen wir nun die tatsächlich beobachtete Giftwirkung der beiden Salze.

Für die Inositphosphorsäure fanden Gilbert und Lippmann[1]) folgende toxische und letale Dosen: Bei peritonealen und subcutanen Einspritzungen sind von dem neutralen Salz 2 bis 2,25 g per Kilogramm Meerschweinchen notwendig, um den Tod in 2 bis 3 Tagen herbeizuführen. Die subcutane tödliche Dosis fürs Kaninchen ist 2,75 bis 3 g per Kilogramm Tier. An den Injektionsstellen beobachtet man die Bildung von Ödemen, die einem ausgedehnten Schorf Platz machen. Bei intravenöser Injektion sind rund 0,05 bis 0,055 g in 3%iger Lösung pro Kilogramm Tier tödlich. Doch hängt die tödliche Dosis sehr von Geschwindigkeit der Injektion sowie von der Konzentration der Lösung ab. So erhöht sich die tödliche Dosis bis zu 0,07 g pro Kilogramm Tier bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 10 Minuten pro Kubikzentimeter, sinkt aber auf 0,04 g, wenn man die 3%ige Lösung durch eine 15%ige ersetzt.

[1]) Gilbert und Lippmann, La Presse médicale 1904, Nr. 69.

Es ist daraus sofort ersichtlich, daß diese Menge der Inositphosphorsäure der toxischen bzw. letalen Dosis der Pyrophosphorsäure sehr nahe steht und nicht zum Ausdruck gelangen könnte, wenn man äquimolekulare Lösungen miteinander vergleichen würde: Jedenfalls darf man der Inositphosphorsäure keine spezifische Giftwirkung zuschreiben.

Ganz das gleiche gilt von einer zweiten organischen Phosphorsäure, der Glycerinphosphorsäure. Das Molekulargewicht des glycerinphosphorsauren Natriumsalzes beträgt $216 + 7\,H_2O = 342$. Daß hier das gleiche gilt wie in den übrigen mitgeteilten Fällen, daß nämlich nicht äquimolekulare Lösungen verglichen werden dürfen, das zeigen die folgenden Versuche:

Ein Kaninchen von 1700 g erhält innerhalb 20 Minuten 40 ccm einer 5,5%igen Lösung des Natronsalzes der Glycerinphosphorsäure, ohne die geringsten Erscheinungen einer Vergiftung weder sofort noch später zu zeigen.

Um nun wieder hinsichtlich des P_2O_5-Gehaltes eine der früher verwendeten Pyrophosphatlösung äquivalente Lösung des Glycerophosphats zu injizieren, wurden 6,8 g des Natronsalzes in 50 ccm dest. Wassers gelöst. Die Lösung reagiert alkalisch.

Ein Kaninchen von 1900 g erhielt davon intravenös 5 ccm. Das Tier wird unruhig. Bei weiterer Injektion treten immer mehr die Symptome der Salzwirkung hervor, während die früher beobachteten bei dieser Konzentration noch nicht zum Ausdruck kommen. Zu berücksichtigen wird wohl hier auch der Glycerinrest sein. Hinsichtlich seiner Phosphatwirkung muß demnach glycerinphosphorsaures Natrium dem Dinatriumphosphat gleichgesetzt werden.

Für die organischen phosphorsauren Salze gilt somit das gleiche wie für die anorganischen: Innerhalb gewisser Grenzen treten nach intravenöser Injektion keinerlei Symptome auf. Injiziert man jedoch den toxischen Dosen der Pyrophosphorsäure äquivalente Mengen, so treten Erscheinungen auf wie bei diesen, und diese müssen ebenfalls als Wirkung des Kations angesehen werden.

III.

Im Anschluß an die Versuche über die toxische Wirkung der Glycerophosphate mögen einige Versuche mitgeteilt werden,

die über das Schicksal der Glycerinphosphorsäure im Tierkörper Aufschluß geben.

Aus den früheren Untersuchungen über diesen Gegenstand seien die Untersuchungen von Sotnitschewsky[1]) erwähnt, der Glycerinphosphorsäure als normalen Harnbestandteil fand, sowie die Arbeiten Marforis[2]), auf Grund deren der Autor zu dem Schlusse kam, daß Glycerinphosphorsäure im Körper vollständig gespalten und die Phosphorsäure als anorganische quantitativ im Harne wieder erscheint. Die Glycerinphosphorsäure des Lecithins soll dagegen wenigstens zum Teile retiniert werden.

Zunächst handelte es sich darum, Glycerinphosphorsäure neben anderen organischen und anorganischen Phosphaten im Harne nachzuweisen. Auf Grund der analytischen Befunde über den Phosphatnachweis, die zum Teil bei den Versuchen über die biologische Bedeutung der Inositphosphorsäure, zum Teil in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilt sind, ist eine Trennung der verschiedenen Phosphorsäuren durch gleichzeitige Anwendung mehrerer Bestimmungsmethoden möglich.

Zu berücksichtigen sind bei Phosphatbestimmungen im Harn die anorganischen und von den organischen die Inosit- und die Glycerinphosphorsäure.

Die anorganischen Phosphate lassen sich von den organischen vollkommen durch die Molybdänbestimmung vor und nach der Veraschung trennen. Die Unterscheidung von Inosit- und Glycerinphosphorsäure kann dadurch erfolgen, daß man neben den beiden Bestimmungen mit Molybdänsalpetersäure noch eine Bestimmung der mit ammoniakalischer Magnesiamixtur fällbaren Phosphate vornimmt.

Man erhält auf diese Weise 3 Fraktionen:

I. Durch ammoniakalische Magnesiamixtur fällbar:
Anorganische Phosphate + Inositphosphorsäure.

II. Durch Molybdänsalpetersäure fällbar:
Anorganische Phosphate.

---

[1]) Sotnitschewsky, Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 214, 1880.

[2]) Marfori, Archivio di fisiologia 2, 217, 1905; 5, 207, 1908; 6, 496, 1909. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Schmiedebergfestschrift, 378, 1909.

III. Nach erfolgter Veraschung durch Molybdänsalpetersäure fällbar:

Gesamtphosphate.

Die Differenz zwischen I und II ergibt den Inositphosphorsäurewert, die Differenz zwischen II und III, abzüglich des Wertes für Inositphosphorsäure, gibt den Gehalt an Glycerinphosphorsäure an.

Die Brauchbarkeit dieser Methodik zeigen die folgenden analytischen Belege:

Zu den Versuchen wurde das Kahlbaumsche glycerinphosphorsaure Natron verwendet; bezüglich der analytischen Untersuchung dieses Präparates sei auf die Belege verwiesen, die in der vorangehenden Arbeit mitgeteilt sind.

Daß die Fällung mit ammoniakalischer Magnesiamixtur neben anorganischen Phosphaten keine Glycerinphosphorsäure mitfällt, zeigt folgender Versuch:

0,9410 g Glycerinphosphorsäure werden in wässeriger Lösung mit 10 ccm Natriumphosphatlösung versetzt, deren Gehalt als 1,7450%ige P_2O_5 ermittelt wurde. Die durch Magnesiamixtur gefällten Phosphate entsprachen einem Gehalt von 0,1745 g P_2O_5.

Den Beweis für die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der Glycerinphosphorsäure im Harn erbringt folgender Beleg:

50 ccm normaler Menschenharn:

I. Durch Molybdänsalpetersäure ermittelt 0,0541 g P_2O_5,
II. Nach erfolgter Veraschung „ 0,0541 g „

50 ccm desselben Harns erhalten 0,5276 g glycerinphosphorsaures Natron zugesetzt = 0,1094 g P_2O_5:

I. Durch Molybdänsalpetersäure ermittelt 0,0541 g P_2O_5,
II. Nach erfolgter Veraschung „ 0,1592 g „

Glycerinphosphorsäure 0,1051 g P_2O_5.

Um darüber Aufschluß zu erhalten, ob überhaupt Glycerinphosphorsäure nach intravenöser oder subcutaner Injektion in den Harn übertritt, erhielten Kaninchen größere Mengen der Substanz injiziert und im Harn wurden dann die Phosphate nach obiger Methode bestimmt.

Die folgende Bilanz gibt die Resultate dieser Versuche wieder.

Kaninchen 1750 g.

9. II. 85 ccm Harn.

I. Durch Molybdänsalpetersäure ermittelt 0,1299 g P_2O_5,
II. Nach erfolgter Veraschung „ 0,1408 g „

= 0,0109 g organ. P_2O_5.

Das Kaninchen erhält subcutan 50 ccm einer Glycerinphosphorsäurelösung = 0,5709 g P_2O_5.

10. II. 75 ccm Harn.

I. Durch Molybdänsalpetersäure ermittelt 0,6880 g P_2O_5,
II. Nach erfolgter Veraschung „ 0,7387 g „

= 0,0507 g organ. P_2O_5

Kaninchen 1700 g.

9. II. 25 ccm Harn.

I. Durch Molybdänsalpetersäure ermittelt 0,0815 g P_2O_5.

Das Kaninchen erhält intravenös innerhalb 20 Minuten 40 ccm einer Glycerinphosphorsäurelösung = 0,4567 g P_2O_5.

10. II. 30 ccm Harn.

I. Durch Molybdänsalpetersäure ermittelt 0,4585 g P_2O_5,
II. Nach erfolgter Veraschung „ 0,5477 g „

0,0892 g organ. P_2O_5.

Im ersten Versuch waren 0,1408 g P_2O_5 ausgeschieden worden, davon 0,0109 g organ. P_2O_5. Nach erfolgter subcutaner Injektion von 0,5709 g organ. P_2O_5 wurden 0,7387 g P_2O_5 = + 0,5979 g, darunter 0,0507 g organ. P_2O_5 = + 0,0398 g ausgeschieden.

Im zweiten Versuch waren 0,0815 g P_2O_5 ausgeschieden worden. Nach erfolgter intravenöser Injektion von 0,4567 g organ. P_2O_5 wurden 0,5477 g P_2O_5 = + 0,4662 g, darunter 0,0892 g organ. P_2O_5 ausgeschieden.

Aus beiden Versuchen geht hervor, daß Glycerinphosphorsäure schon nach 24 Stunden vollkommen im Harn ausgeschieden wird und selbst nach intravenöser Injektion nur zu einem verschwindend kleinen Teile in organischer Bindung.

Diese Resultate, die sich vollkommen mit dem Befunde Marforis decken, legen die Erörterung folgender Fragen nahe:

Münzer[1]) konnte bei einer großen Anzahl von Phosphorvergiftungen feststellen, daß dieselbe zu einer bedeutend gesteigerten Phosphorsäureausscheidung führt und erwähnt, daß

[1]) E. Münzer, Der Stoffwechsel des Menschen bei akuter Phosphorvergiftung. Deutsch. Arch. f. klin. Med. 52, 199, 1892.

vielleicht als Folge des durch die Vergiftung gesteigerten Zellzerfalls auch organische, und zwar Glycerinphosphorsäure im Harne auftreten könnte. Da die eben mitgeteilten Versuche aber zeigten, daß selbst reichlich in die Blutbahn gebrachte Glycerinphosphorsäure in kürzester Zeit und fast vollkommen in anorganischer Form ausgeschieden wird, erschien es unwahrscheinlich, wenigstens beim Kaninchen, bei Phosphorvergiftung vermehrte Glycerinphosphorsäure zu finden.

Um die Frage zu entscheiden, erhielten die beiden Kaninchen der früher angeführten Versuche, deren Phosphatausscheidung nunmehr bekannt war, je 0,01 g Phosphor zu 0,2% in Öl gelöst per os. Die Tiere nahmen keine Nahrung mehr auf. An den beiden nächsten Tagen schied das Kaninchen I 0,4333 g P_2O_5 aus, darunter 0,0013 g in organischer Bindung;

Kaninchen II 0,4415 g ohne nachweisbare organ. Phosphorsäure.

Am nächsten Tage gingen die Tiere zugrunde. Die Sektion ergab die typischen Befunde der Phosphorvergiftung, Leberverfettung, Blutungen usw.

Es ist wohl als wahrscheinlich anzunehmen, daß auch beim Menschen ähnliche Verhältnisse vorliegen, d. h. der vermehrte P_2O_5-Gehalt des Harns ausschließlich in anorganischer Form vorhanden ist. Doch werden immerhin derartige Untersuchungen beim Menschen noch vorzunehmen sein.

Schließlich machen es die mitgeteilten Beobachtungen auch fraglich, ob der normale Harn Glycerinphosphorsäure enthält; denn wenn der Körper selbst bei Überschwemmung desselben mit dieser Substanz diese schon fast vollkommen spaltet, erscheint es unwahrscheinlich, daß normalerweise Zentigramme derselben zur Ausscheidung kommen sollten. Da außerdem früher nachgewiesen wurde, daß die im normalen Harn auftretende organische Phosphorsäure Inositphosphorsäure ist, kann Glycerinphosphorsäure nicht als ein normaler Harnbestandteil angenommen werden.

Zur Methodik der Bestimmung des Kohlenstoffes organischer Substanzen auf nassem Wege.

Von

Franz Tangl und Georg v. Kereszty.

(Aus der Kgl. Ung. tierphysiol. Versuchsstation in Budapest.)

(Eingegangen am 28. März 1911.)

Mit 3 Figuren im Text.

Die Bestimmung des C in tierischen Flüssigkeiten auf dem Wege der gewöhnlichen Elementaranalyse ist sehr umständlich und zeitraubend, so daß schon verschiedene Versuche gemacht wurden, dieselbe durch eine einfachere, dabei aber doch genaue Methode zu ersetzen. Eine der besten ist wohl die Brunner-Messinger-Methode[1]) der Verbrennung mittels H_2SO_4 und $K_2Cr_2O_7$ besonders in der Modifikation von W. Scholtz[2]), die hauptsächlich darin besteht, daß die CO_2 nicht gewichtsanalytisch, sondern titrimetrisch bestimmt wird.

Der Zweck dieser Mitteilung ist, das Brunner-Messinger-sche Verfahren, das uns bei den außerordentlich zahlreichen C-Bestimmungen, die wir damit an den verschiedensten organischen Verbindungen, pflanzlichen und tierischen Produkten ausführten, ausgezeichnete Dienste leistete, in der allerdings nicht wesentlichen Modifikation ganz kurz zu beschreiben, in der wir sie anwenden. Wir verzichten dabei auf eine ausführliche Besprechung des Prinzips der verschiedenen Modifikationen des Verfahrens, das in der Technik bei Eisenuntersuchungen häufige Anwendung findet, und verweisen diesbezüglich auf die Mitteilung von W. Scholtz und auf das bekannte Handbuch von Lunge[3]).

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 2910; 23, 2756.

[2]) Centralbl f. inn. Med. 18. Jahrg. 1897. Nr. 15 u. 16.

[3]) Lunge, Chem.-techn. Untersuchungsmethoden. 5. Aufl. 1905. Bd. II. S. 56.

Ursprünglich verfuhren wir ganz nach der Vorschrift von W. Scholtz und benutzten seinen Aufschließkolben. Ein wesentlicher Nachteil des letzteren, mit seinen verschiedenen Ansätzen, ist die Leichtigkeit, mit der er beim Anwärmen zerspringt. Deshalb haben wir die Form des Kolbens geändert und zugleich die von Wüst angegebene Kühlvorrichtung mit einer geringen Modifikation gewählt, die sich sehr gut bewährte. Wir benutzen jetzt ausschließlich den mit eingeschliffenem Kühleinsatz versehenen Kolben, wie ihn Fig. 1 zeigt.

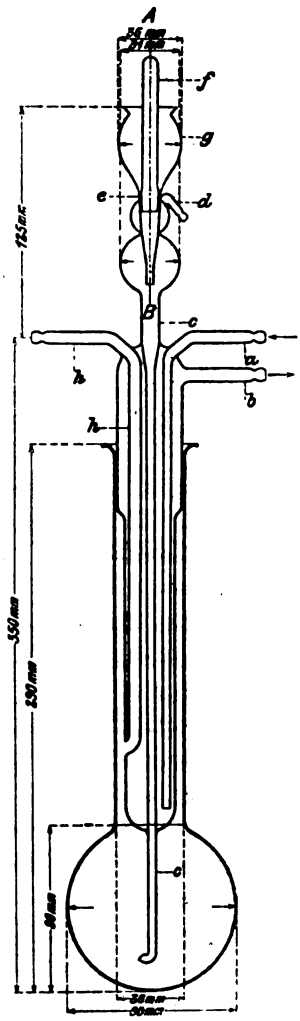


Fig. 1.

Der aus Jenenser Glas geblasene, gut gekühlte Aufschließkolben ist ganz glatt, hat keinen angeschmolzenen Ansatz, ist also dementsprechend viel weniger zerbrechlich, und wenn er zerbricht, viel leichter und um bedeutend weniger Kosten ersetzbar. (Die Dimensionen des Kolbens sind in der Zeichnung angegeben.) Im Kolbenhalse ist eine Schliffstelle, die ein luftdichtes Einsetzen des Kühlers ermöglicht, der ebenfalls eine entsprechende Schliffstelle trägt. Zur Sicherung der Dichtung ist der obere Rand des Kolbens umgekrämpt, wodurch um den Kühler eine kreisförmige Rinne gebildet wird, die man mit einigen Tropfen konzentrierter H_2SO_4 anfüllt. Wie schon Beckert für die Wüstsche Anordnung bemerkt, mit der unsere ganz übereinstimmt, hat diese den nicht hoch genug anzuschlagenden Vorteil, daß man den Kolben vom Kühler sehr leicht herunterziehen kann, ohne die verschiedenen Schlauchverbindungen zu lösen.

In den Kolben paßt luftdicht ein Kühleinsatz, der, wie die Abbildung zeigt, bis zur kugelförmigen Erweiterung des Kolbens herabreicht und sämtliche Ansätze trägt. Die An-

sätze *a* und *b* dienen zum Zu- und Ableiten des strömenden Kühlwassers. Die mittlere Röhre *c*, die bis 10 bis 12 mm über den Boden des Kolbens reicht, setzt sich nach oben in eine kugelförmige Erweiterung fort, die im Längsschnitt in Fig. 2 abgebildet ist. Der seitliche Ansatz *d* dient zur Zuleitung der CO_2-freien Luft während der Verbrennung, die Schliffstelle im Halse *e* zum luftdichten Einsetzen des Glasstöpsels *f*; in den Trichter *g* wird die nötige Menge H_2SO_4 gegossen und durch leichtes Lüften des Glasstöpsels *f* in kleinen Portionen in den Kolben gelassen. Überschüssige H_2SO_4, die im Trichter bleibt, dient zur Dichtung.

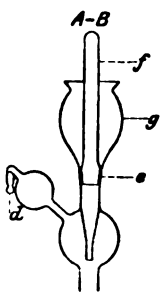


Fig. 2.

Durch den Kühler geht auch die Röhre *h*, die seitlich unten mündet und oben in einen Ansatz *h* ausläuft. Sie dient zum Ableiten der durch *d*, *c* zugeleiteten Luft. Den Wüstschen[1]) Kühler haben wir nur insofern modifiziert, als wir diese Röhre *h* in den Kühler versetzten, wodurch die chromhaltigen, flüchtigen Produkte besser zurückgehalten wurden.

Die Zusammenstellung des ganzen Apparates, wie wir ihn jetzt verwenden, zeigt Fig. 3.

Die mit 25%iger KOH-Lösung gefüllte Waschflasche *1* und der Natronkalkturm *2* reinigen die in den Apparat gesaugte Luft von CO_2, die H_2SO_4 in der Waschflasche *3* entwässert sie. Der Aufschließkolben *4* ist an einem Stativ über einen mit einer Asbestplatte bedeckten Dreifuß befestigt; unter dem Dreifuß befindet sich ein Bunsenbrenner, der in der Zeichnung nicht abgebildet ist. Die Waschflasche *5* enthält wenig konzentrierte H_2SO_4. Dann folgt ein Verbrennungsrohr in einem Verbrennungsofen *6*, wie er zu Elementaranalysen verwendet wird. Die Verbrennungsröhre ist nur in einer Länge von 30 bis 40 cm mit CuO-Asbest oder gekörntem CuO gefüllt. Dieser Teil der Röhre wird wie bei der Elementaranalyse bis zum Glühen des CuO angeheizt. Hinter der angeheizten Strecke folgt eine etwa 6 bis 8 cm lange Strecke, die mit körnigem PbO_2 gefüllt ist, das sich zwischen zwei Asbestpfropfen befindet. Dieser Teil der

[1]) Lunge, l. c. S. 59.

Röhre ist von einer mit einem Thermometer versehenen Metallkapsel *7* umgeben, die von unten mit einem kleinen Bunsenbrenner angeheizt wird. (Der Brenner ist in der Zeichnung nicht angegeben.)

Wie Fig. 3 zeigt, liegt das Verbrennungsrohr in einem elektrischen Ofen, doch kann natürlich ebensogut ein mit Gasflammen geheizter verwendet werden. Neuerdings benutzten wir den Preglschen[1]) Doppelofen, in dem zwei Verbrennungen gleichzeitig ausgeführt werden können. Den kurzen Kopferschen Ofen, den W. Scholtz benutzt, haben wir später nicht mehr verwendet, weil er wenigstens in der Form, wie wir ihn bezogen haben, leicht zu einer Überhitzung der PbO_2-Schicht führte. Dagegen leistet der Preglsche Doppelofen in derselben Zusammenstellung mit derselben Röhrenfüllung, wie sie Pregl für die Elementaranalyse angibt, ausgezeichnete Dienste.

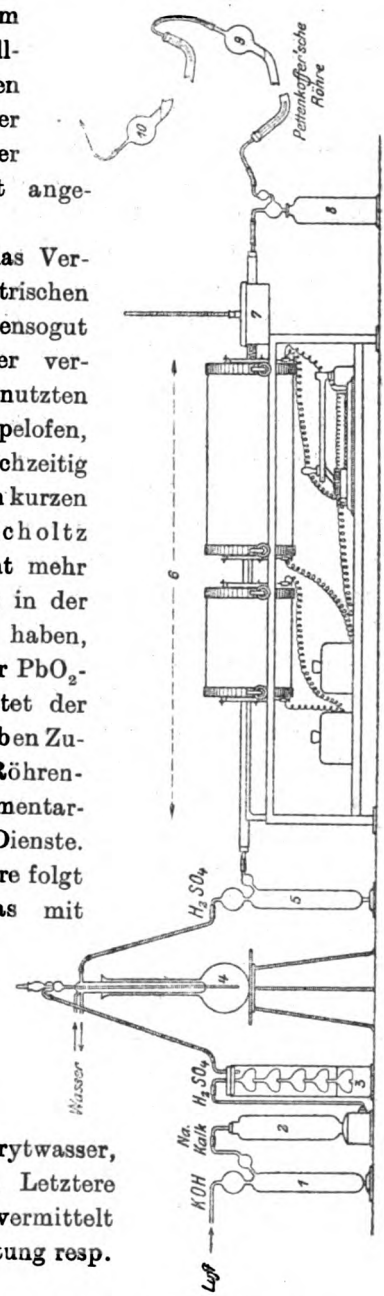


Fig. 3.

Nach der Verbrennungsröhre folgt eine Waschflasche *8*, die etwas mit H_2SO_4 angesäuertes Wasser enthält, damit die durchgesaugte Luft mit Wasserdampf gesättigt in die Barytröhre *9* tritt. Barytröhren sind zwei hintereinandergeschaltet, die erste, *9*, faßt 300 ccm Barytwasser, die zweite kleinere, *10*, 100 ccm. Letztere dient nur zur Kontrolle und vermittelt die Verbindung mit der Saugleitung resp. Wasserstrahlpumpe.

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jahrg. XXXVIII, 2, 1905.

Die einzelnen Teile des Apparates sind mittels möglichst kurzer Kautschukschlauchstücke miteinander luftdicht verbunden.

Vor allem überzeugt man sich davon, ob alle Teile des Apparates luftdicht schließen. Dann bringt man 8 bis 10 g vorher bis zum Schmelzen erhitztes Kaliumbichromat in den Aufschließkolben, setzt den Kühler ein und saugt noch vor der Einschaltung der Barytröhren in langsamem Strome Luft durch den Apparat, um ihn vollständig mit CO_2-freier Luft zu füllen. Gleichzeitig wird der CuO enthaltende Teil der Verbrennungsröhre bis zur Rotglut, der PbO_2 enthaltende Teil auf 150 bis 180° C erhitzt.

Nachdem der Apparat genügend durchventiliert ist — ($^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde) — werden die Barytröhren eingeschaltet und die zu verbrennende Substanz in den Aufschließkolben gebracht. Soll eine feste Substanz verbrannt werden, so werden genau gewogene, 0,1 bis 0,3 g (eventuell in Stanniol gewickelt), nach Herausheben des Kühlers in den Kolben geworfen. Soll eine flüssige Substanz verbrannt werden, z. B. Harn, so kann man sie mittels einer (geeichten) Pipette nach Entfernung des Stöpsels durch die Röhre *c* in den Kolben fließen lassen. Was an der Röhrenwand haftet, wird später durch die zufließende H_2SO_4 in den Kolben gespült. Vom Harn nimmt man gewöhnlich 5 ccm. Dann wird der Stöpsel *f* eingesetzt und in den Trichter *g* die H_2SO_4 gegossen.

Wir erhitzen jedesmal die zur Verbrennung benutzte reine konzentrierte H_2SO_4 vorher längere Zeit, damit jede Spur eventuell darin vorhandener C-haltiger Substanzen zerstört werde. Aus demselben Grunde schmelzen wir das Kaliumbichromat.

Nachdem der Wasserstrom durch den Kühler in Gang gesetzt ist, beginnt man mit dem Durchsaugen von Luft. Den Luftstrom regelt man so, daß pro Sekunde 2 bis 3 Bläschen durch das Barytwasser streichen. Dann beginnt man mit der äußerst vorsichtigen Zuführung der H_2SO_4, indem man den Stöpsel *f* sehr wenig und langsam lüftet, so daß nur einige Tropfen H_2SO_4 durch die Röhre *e* in den Kolben fließen. Die Reaktion ist, besonders wenn kohlenhydrathaltige Substanzen verbrannt werden, eine sehr heftige, die Gasentwicklung besonders anfangs eine sehr stürmische, so daß man die H_2SO_4

nur in sehr kleinen Portionen und langsam zufließen lassen kann. Man bringt so anfangs allmählich, später in größeren Portionen die ganze zu einer Verbrennung nötige H_2SO_4 (130 bis 140 ccm) in den Kolben.

Sobald die ganze H_2SO_4 im Kolben ist und die Gasentwicklung aufgehört hat, beginnt man mit dem vorsichtigen Erhitzen des Kolbens, das man so lange erhöht, bis der Kolbeninhalt in lebhaftes Sieden gerät, und erhitzt so lange, bis die Zersetzung vollkommen beendet ist. Das erkennt man daran, daß die Gasentwicklung — feine Bläschenbildung — aufhört und der Kolbeninhalt eine hellgrüne Färbung annimmt, was nach 2 bis $2^1/_2$ stündigem Sieden immer eintritt.

Nach Abstellen der Flamme wird noch $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde lang Luft durchgesaugt, um alle CO_2 in die Barytröhren zu schaffen.

Während der ganzen Zeit muß das CuO in der Verbrennungsröhre in Rotglut erhalten und sorgfältig darauf geachtet werden, daß die Temperatur des PbO_2 nicht über 180 bis 200° C steigt. So werden einerseits die flüchtigen unvollständigen Oxydationsprodukte in der CuO-Schicht vollständig verbrannt und anderseits die flüchtigen S- und Cl-haltigen Verbindungen im PbO_2 sicher zurückgehalten. Wird das PbO_2 stärker erhitzt, so gehen sehr leicht Halogenverbindungen in das Barytwasser über und machen die C-Bestimmung unbrauchbar.

Werden die oben angegebenen Versuchsbedingungen genau eingehalten, so kann man selbst bei viel N-, Cl- und S-haltigen Substanzen im Barytwasser weder Nitrat noch Sulfat oder Cl-Ionen nachweisen.

Das Titrieren des Barytwassers erfolgt dann in der bekannten Weise. Wir benutzen gewöhnlich eine 0,06 bis 0,09 n-$Ba(OH)_2$-Lösung, die wir mit 0,05 n HCl und Phenolphthalein als Indicator titrieren.

Hat man einen Doppelverbrennungsofen, so kann man, wie schon erwähnt, zwei Verbrennungen zu gleicher Zeit in ca. 3 Stunden ausführen.

Außer dem vereinfachten Aufschließkolben mit seinem eingesetzten Kühler, weicht unsere Einrichtung von der Scholtzschen hauptsächlich durch das Weglassen der kurzen Verbrennungsröhre ab, die wir durch eine längere ersetzten. Die

Verbrennungsröhre ist bei Scholtz nur 35 cm lang und in einer Länge von 18 cm mit CuO gefüllt; sie ruht in dem Blechgestell des Kopferschen Ofens. Unsere Verbrennungsröhre ist länger, auch ist die CuO-Schicht länger; die Hauptsache jedoch ist, daß die erhitzte Strecke von der PbO_2-Schicht weiter weg kommt, so daß die letztere leichter und sicherer vor Überhitzung bewahrt werden kann.

Anfangs hatten wir den kurzen Ofen benutzt und mit reinen, S- und Cl-freien Substanzen, und mit frischer PbO_2-Schicht gute Resultate erhalten. Benutzten wir dagegen eine Röhre, die vorher schon zu Verbrennungen von Harn gedient hatte, so erhielten wir sehr oft zu hohe Werte. So erhielten wir z. B. bei der Verbrennung

	auf nassem Wege	bei trockener Elementaranalyse
von Phthalsäureanhydrid . .	63,06% C	61,49% C
von Mais	53,91% C	45,88% C
von trockenem Hammelkot .	51,06% C	41,88% C

Auch überzeugten wir uns davon, daß je länger die Verbrennung dauerte, desto größer die Abweichungen waren. W. Scholtz selbst gibt an, daß er bei der Verbrennung von Substanzen, „deren Zusammensetzung gerade für die Stoffwechselpathologie von Interesse ist", teils zu stark abweichende, teils unkonstante Ergebnisse erhielt. Dabei handelte es sich viel häufiger um ein Plus an gefundener Kohlensäure als um den entgegengesetzten Fehler. Dazu bemerkt Sch., daß bei diesem Fehler nach zahlreichen Einzeluntersuchungen „das Unzureichende der Trockenvorlagen eine Hauptrolle spielt". Diese Bemerkung bezieht Sch. allerdings auf jene Versuche, in denen er die CO_2 gewichtsanalytisch bestimmte.

Durch zahlreiche Versuche überzeugten wir uns davon, daß wir nur dann so große Abweichungen und unkonstante Werte erhielten, wenn entweder Cl-haltige Substanzen verbrannt wurden oder wenn wir, wie schon erwähnt, auch eine Cl-freie Substanz mit einer Röhre verbrannten, die vorher zu Harnverbrennungen benutzt wurde. Wir haben uns durch zahlreiche Einzeluntersuchungen dann überzeugt, daß in diesen Fällen in der Barytlauge Cl nachzuweisen war, und zwar in einer Menge, die bei etwa 50% C-Gehalt der verbrannten Substanz einen

Fehler von 2 bis 3% verursachen konnte. Das Cl konnte nur aus der PbO_2-Schicht stammen, und zwar durch Überhitzen derselben, das eingetreten sein muß, trotzdem das in der Blechkapsel steckende Thermometer nie eine Temperatur über 200° C zeigte. Daß unsere Vermutung richtig war, bewiesen unsere weiteren Versuche, die wir mit einer längeren Verbrennungsröhre anstellten, bei der der letzte Brenner unter der CuO-Schicht vom PbO_2 entfernter war. So bekamen wir ganz tadellose Werte und deshalb verließen wir den kleinen Kopferschen Ofen und benutzten seither entweder den in Fig. 2 abgebildeten elektrischen Ofen oder noch besser den Preglschen Doppelofen für Elementaranalysen. In beiden ist die PbO_2-Schicht vor Überhitzung besser geschützt. Mit der längeren Verbrennungsröhre erhielten wir auch bei Cl-reichen organischen Substanzen und bei lang dauernden Verbrennungen sehr gute Werte. Als Beispiele mögen folgende dienen:

verbrannte Substanz	auf nassem Wege	berechnet:
Thiocarbamid	16,00% C	15,80% C
Salicylsäure	61,04% C	60,86% C
		bei trockener Verbrennung
Kleber	51,73% C	51,78% C
Hammelkot	47,68% C	47,30% C

Bei den letzten zwei Substanzen haben wir vor der Verbrennung noch NaCl der Substanz im Aufschließkolben zugesetzt.

Die C-Bestimmung auf nassem Wege, in der angegebenen Weise ausgeführt, erfordert kaum mehr Zeit wie eine Kjeldahl-Bestimmung, und nur im Anfange der Verbrennung eine gespannte Aufmerksamkeit und ständige Aufsicht. Ist einmal die ganze H_2SO_4 im Kolben und hat man für einen gleichmäßigen Luftstrom gesorgt, so ist eine ständige Aufsicht nicht mehr nötig. Es ist überflüssig, auf die großen Vorteile dieser nassen Verbrennung von tierischen Flüssigkeiten hinzuweisen. Die ausreichende Genauigkeit empfiehlt sie auch zur C-Bestimmung in trockenen Substanzen, so daß man bei Bestimmung des C-Umsatzes bei Stoffwechseluntersuchungen die trockene Elementaranalyse entbehren kann.

Zur Kenntnis der Bakterienproteasen.

Von

Kurt Meyer.

(Aus dem sero-bakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin.)

(Eingegangen am 1. April 1911.)

Bei Gelegenheit von Untersuchungen über die Antikörper von Bakterioproteasen wurden einige Beobachtungen über die Enzyme selbst gemacht, über die nachstehend berichtet werden soll.

Zur Untersuchung kamen das in Kulturfiltraten enthaltene caseinspaltende Ferment des Bacillus prodigiosus und des Bacillus pyocyaneus. Die fermenthaltigen Flüssigkeiten wurden beim Bacillus prodigiosus durch Filtration mit Reichel-Kerzen, beim Bacillus pyocyaneus durch einfache Papierfiltration gewonnen. Sie wurden durch Thymolzusatz konserviert.

Die Kulturen wurden auf gewöhnlicher, gegen Lackmus schwach alkalischer Nährbouillon mit und ohne Glycerinzusatz angelegt. Während beim Prodigiosus der Glycerinzusatz ohne Einfluß auf die gebildete Fermentmenge war, wurde in den Pyocyaneuskulturen durch einen Zusatz von 4% Glycerin die Fermentproduktion erheblich gesteigert. Bei Prodigiosuskulturen war die maximale Wirksamkeit nach 2 bis 3 Wochen erreicht, bei Pyocyaneuskulturen bereits nach 1 bis 2 Wochen. Die Verdauungsversuche wurden mit Hilfe der Caseinmethode in der in einer früheren Arbeit[1]) beschriebenen Weise ausgeführt.

Über das Reaktionsoptimum der Bakterienproteasen.

Um die Beziehung der Bakterienproteasen zu den anderen eiweißspaltenden Fermenten festzustellen, wurde zunächst bestimmt, bei welcher Reaktion sie ihre stärkste Wirksamkeit entfalten. Es wurde zu diesem Zweck ihre Verdauungswirkung in Gegenwart verschiedener Regulatorengemische (nach Sörensen[2])) festgestellt, und zwar wurden in jedem Versuch

[1]) Kurt Meyer, diese Zeitschr. 23, 68, 1909.

[2]) Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

fallende Mengen der Fermentlösung mit 0,85%iger Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllt und je 2 ccm Regulatorengemisch und Caseinlösung zugefügt. Als Antisepticum wurde Thymol zugefügt. Die Versuchsdauer betrug, wenn nicht anders bemerkt, 2 Stunden.

Da eine ganz genaue Bestimmung des Reaktionsoptimums nicht beabsichtigt und mit der Caseinmethode auch nicht ausführbar war, so wurde nur in Gegenwart folgender Gemische untersucht.

										Wasserstoffionenexponent
Gemisch	1	1 ccm	sek.	Phosphat	+	9 ccm	prim.	Phosphat		5,910
„	2	3 „	„	„	+	7 „	„	„		6,468
„	3	5 „	„	„	+	5 „	„	„		6,813
„	4	7 „	„	„	+	3 „	„	„		7,146
„	5	9 „	„	„	+	1 „	„	„		7,648
„	6	6 „	Borat	+	4 ccm	HCl	. . . . .			8,289
„	7	9 „	„	+	1 „	H	. . . . .			9,087
„	8	9 „	„	+	1 „	NaOH	. . . . .			9,360
„	9	6 „	„	+	4 „	„	. . . . .			9,974

Die Verdauungswirkung der Proteasen gestaltete sich in diesen Gemischen folgendermaßen:

Tabelle I.

Prodigiosusprotease	0,2	0,15	0,1	0,07	0,05 ccm		
Gemisch 1	±	±	±	+	++		
„ 2	—	?	±	±	+		
„ 3	—	—	±	±	+		
„ 4	—	—	?	±	±		
„ 5	—	—	±	+	+		
„ 6	—	±	±	+	++		
„ 7	?	±	±	+	++		
Pyocyaneusprotease	**0,5**	**0,3**	**0,2**	**0,15**	**0,1**	**0,05**	**0,02 ccm**
Gemisch 2	?	±	±	+			
„ 3	—	—	—	?	±		
„ 4	—	—	—	—	—	—	?
„ 5	—	—	—	—	—	?	±
„ 6	—	—	—	—	—	±	±
„ 7	—	—	—	±	±	+	+

Hier wie in den folgenden Tabellen bedeutet — keine, ± schwache, + ausgesprochene, ++ starke Trübung beim Ansäuern.

Das Optimum liegt also sowohl für die Prodigiosusprotease wie für die Pyocyaneusprotease bei einer Wasserstoffionenkonzentration $= 10^{-7,146}$, d. h. da die neutrale Reaktion einer H·-

Konzentration von $10^{-7,07}$ entspricht, bei ganz schwach alkalischer Reaktion.

Die Bestimmung des Reaktionsoptimums des Trypsin-Grübler nach derselben Methode ergab folgende Werte.

Tabelle II.

Trypsin 1:500	0,5	0,3	0,2	0,15	0,1 ccm
Gemisch 2	?	±	+	+	++
„ 3	—	—	±	±	+
„ 4	—	—	?	±	±
„ 5	—	—	—	—	?
„ 6	—	—	—	—	?
„ 7	—	—	—	±	±
„ 8	±	±	±	+	+
„ 9	+	+	++		

Das Optimum des Trypsins liegt also bei etwas stärker alkalischer Reaktion ($10^{-7,648-8,289}$) als das der Bakterioproteasen. Trotzdem werden wir diese nach ihrem Reaktionsoptimum zu den Tryptasen rechnen dürfen. Damit stimmt überein, daß Mesernitzki[1]) bei der Verdauung von Gelatine durch die Prodigiosusgelatinase reichliche Abspaltung von Aminosäuren beobachtet.

Verhalten der Bakterioproteasen beim Erwärmen.

Bei der Prüfung der Thermoresistenz der Prodigiosusproteasen ergab sich ein eigentümliches Verhalten. Zunächst fand sich die Angabe Mesernitzkis über die Coctostabilität der Prodigiosusprotease bestätigt. 15 Minuten langes Erhitzen der Protease auf 100° bewirkte eine nur unerhebliche Abschwächung ihrer Wirksamkeit. Überraschenderweise hatte dagegen $^1/_2$stündige Erwärmung auf 56° eine ganz bedeutende Verminderung der Wirksamkeit zur Folge.

Tabelle III.

Prodigiosusprotease	unerhitzt	30′ erhitzt auf 56°	65°	75°	85°	5′ erhitzt auf 100°	15′ erhitzt auf 100°
1,0 ccm	—	±	—	—	—	—	—
0,5 „	—	+	—	—	—	—	—
0,2 „	—	+	±	—	—	—	?
0,1 „	—	++	+	+	±	±	+
0,05 „	±						

[1]) Mesernitzki, diese Zeitschr. 31, 109, 1910.

Es ergab sich weiter, daß diese Inaktivierung bei 56° schon nach 5 Minuten eingetreten war. Die Inaktivierungstemperatur lag bei den zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Fermentlösungen nicht immer in der gleichen Höhe, sondern bisweilen etwas höher, bei 65 bis 75°.

Das eigentümliche Verhalten der Prodigiosusprotease beim Erhitzen — Hata[1]) scheint übrigens schon ähnliches beobachtet zu haben — erinnert an die Befunde von Landsteiner und v. Rauchenbichler[2]) über das Verhalten des Staphylolysins beim Erwärmen. Nach diesen Autoren wird das Staphylolysin beim Erhitzen auf 65° inaktiviert, bei weiterem Erhitzen auf 100° aber wieder wirksam. Man konnte hiernach vermuten, daß auch bei der Prodigiosusprotease eine solche reversible Inaktivierung stattfindet, die bei der sofortigen Erhitzung auf 100° dem Nachweis entgeht. Es zeigte sich aber, daß die einmal bei 56° inaktivierte Protease durch Erhitzen auf 100° nicht wieder wirksam wird. Auch insofern ergab sich ein Unterschied gegenüber dem Staphyloysin, als auch in verdünnter Lösung die Inaktivierung bei 56° eintrat. Allerdings konnte nur eine Verdünnung 1:5 geprüft werden, da sonst die Volumina zu groß geworden wären, während Landsteiner und v. Rauchenbichler die Inaktivierung erst bei einer Verdünnung 1:100 ausbleiben sahen.

Landsteiner und v. Rauchenbichler konnten die Erscheinung beim Staphylolysin darauf zurückführen, daß das Staphylolysin bei 65° mit gewissen in der Kulturflüssigkeit enthaltenen Bakterienprodukten eine durch Kochen reversible Verbindung eingeht. Auch mit Serumeiweiß konnten sie eine ähnliche reversible Inaktivierung herbeiführen.

Man wird bei der Inaktivierung der Prodigiosusprotease einen ähnlichen Vorgang annehmen müssen, mit dem Unterschied jedoch, daß die Verbindung irreversibel ist. Daß beim Erhitzen auf 100° keine oder nur eine geringe Inaktivierung eintritt, wäre damit zu erklären, daß die Fermentlösung zu kurze Zeit die Temperaturbreite passiert, in der die inaktivierende Verbindung eintritt und daß diese daher nur in ganz geringer Menge gebildet wird. Wahrscheinlich ist die geringe Abschwächung, die beim Erhitzen auf 100° beobachtet wird, darauf zurückzuführen, daß die Flüssigkeit beim Erwärmen wie beim Abkühlen kurze Zeit die kritische Temperatur hat. Für diese Annahme spricht, daß häufig 15 Minuten langes Erwärmen auf 100° eine kaum stärkere Abschwächung bewirkt als kurzes Aufkochen.

[1]) S. Hata, zit. nach Centralbl. f. Bakt., Ref. 34, 208, 1904.

[2]) Landsteiner und v. Rauchenbichler, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Orig. 1, 439, 1910.

Noch eine andere Erklärungsmöglichkeit bot sich: Bearn und Cramer[1]) und andere haben die Bildung von Zymoiden bei Erhitzen der Enzyme auf 60° beschrieben. Diese Zymoide wirken hemmend auf die homologen Enzyme. Bei 100° werden sie zerstört; nur das Labzymoid ist thermostabil. Man konnte daran denken, daß die Inaktivierung der Bakterioproteasen auf die Entstehung solcher Zymoide zurückzuführen sei. In diesem Sinne angestellte Versuche ließen aber keine Hemmungswirkung der inaktivierten Proteasen erkennen.

Bei der Pyocyaneusprotease war das Inaktivierungsphänomen weniger deutlich ausgesprochen, aber doch erkennbar. Die kritische Temperatur liegt hier bei 85° (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Pyocyaneusprotease	unerhitzt	30′ erhitzt auf 56°	65°	75°	85°	5′ erhitzt auf 100°	15′ erhitzt auf 100°
0,5 ccm	—	—	—	—	?	—	—
0,2 „	—	—	—	±	+	±	±
0,1 „	—	—	±	+	++	+	+
0,05 „	±	±					

Die Coctostabilität ist auch bei der Pyocyaneusprotease vorhanden. Die geringe Abschwächung der Wirksamkeit bei 100° ist wahrscheinlich in ähnlicher Weise zu erklären wie bei der Prodigiosusprotease.

Die Thermoresistenz der Bakterioproteasen muß außerordentlich überraschen. Galt durch die Thermolabilität der Fermente bisher als eine ihrer wesentlichsten Eigentümlichkeiten. Allerdings mehren sich in neuerer Zeit die Angaben über eine weniger große Hitzeempfindlichkeit mancher Enzyme. Ferner ist von Schmidt[2]) besonders auf die Schutzwirkung von Kolloiden gegenüber der Hitzeschädigung hingewiesen worden.

Mit Rücksicht auf diese Angaben konnte daran gedacht werden, daß die in den Bouillonkulturen enthaltenen Proteine eine Schutzwirkung auf die Proteasen ausüben. Es zeigte sich aber, daß das Filtrat einer auf eiweißfreiem Nährboden nach Fränkel-Uschinsky gezüchteten Prodigiosuskultur, das offen-

[1]) Bearn und Cramer, Biochem. Journ. 2, 174, 1907.

[2]) Schmidt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 314, 1910.

bar nur geringe Mengen von Kolloiden enthielt, die gleiche Coctostabilität besaß wie die proteinhaltigen Fermentlösungen. Man wird also die Coctostabilität der Bakterioproteasen als eine ihnen eigentümliche Eigenschaft ansehen müssen.

Bei der Coctostabilität der Proteasen schien es möglich, daß auch der Verdauungsvorgang bei 100° abläuft, und zwar entsprechend der hohen Temperatur mit ganz besonderer Beschleunigung. Es ist dies jedoch keineswegs der Fall. Eine Proteasemenge, die bei 37° in $^1/_2$ Stunde völlige Verdauung bewirkt, hatte bei 100° das Casein innerhalb $^1/_4$ Stunde nicht merkbar angegriffen. Es spielen also offenbar sekundäre Prozesse eine Rolle, die noch näherer Erforschung bedürfen.

Zusammenfassung.

Das Reaktionsoptimum der Prodigiosus- und Pyocyaneusprotease liegt bei einer $H^{\cdot}$-Konzentration $=10^{-7,2}$, also bei ganz schwach alkalischer Reaktion. Die Enzyme sind demnach den Tryptasen zuzurechnen.

Die Prodigiosus- und Pyocyaneusprotease sind coctostabil. Bei Temperaturen unter 100°, je nach dem Enzym 56 bis 85°, tritt dagegen mehr oder weniger vollständige Inaktivierung ein, die auch beim Erhitzen auf 100° nicht wieder aufgehoben wird.

Die Bildung von hemmenden Zymoiden bei den Inaktivierungstemperaturen konnte nicht nachgewiesen werden.

Trotz der Coctostabilität der Bakterioproteasen findet bei 100° keine Verdauung statt.

Über Anti-Bakterienproteasen.

Von

Kurt Meyer.

(Aus dem sero-bakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin.)

(*Eingegangen am 1. April 1911.*)

Seitdem von klinischer Seite die Aufmerksamkeit auf die unter pathologischen Verhältnissen eintretenden quantitativen Veränderungen des Serumantitrypsins gelenkt wurde, hat auch die theoretische Forschung den Antiproteasen vermehrtes Interesse geschenkt. Trotz der großen Zahl der Untersuchungen hat sich jedoch eine einheitliche Auffassung über die Natur des Serumantitrypsins nicht durchzusetzen vermocht. Insbesondere ist die Antikörpernatur des Antitrypsins von verschiedenen Seiten in Zweifel gezogen worden.

Bei dem gegenwärtigen Stand der Frage schien ein Fortschritt nur durch vergleichende Untersuchungen an solchen Antiproteasen zu erwarten zu sein, deren Antikörpernatur nach der Art ihrer Erzeugung und ihren Eigenschaften völlig sicher ist. Als geeignetes Untersuchungsobjekt boten sich hier die Antikörper der Bakterioproteasen, über die bisher nur unvollständige Angaben in der Literatur [v. Dungern[1]), Hata[2]), Moreschi[3])] vorliegen.

Bei den nachfolgend mitgeteilten Versuchen wurde mit den Antikörpern der Prodigiosus- und Pyocyaneusprotease gearbeitet, deren Auffassung als Tryptasen in der vorhergehenden Abhandlung begründet wurde. Die Antikörper wurden durch Immuni-

---

[1]) v. Dungern, Münchner med. Wochenschr. 45, 1157, 1898.

[2]) S. Hata, zit. nach Centralbl. f. Bakt. Ref. 34, 208, 1904.

[3]) Moreschi, zit. nach Centralbl. f. Bakt. Ref. 35, 96, 1904.

sierung von Kaninchen mit steigenden Mengen der Proteasen gewonnen.

Die Verdauungsversuche wurden mit Hilfe der Caseinmethode vorgenommen. Bezüglich der Technik sei auf eine frühere Arbeit[1]) verwiesen. Zur Erzielung der optimalen H-Konzentration wurden zu jedem Röhrchen 2 ccm des aus 3 Teilen primärem und 7 Teilen sekundärem Phosphat bestehenden Sörensenschen Regulatorengemisches zugefügt. Die Versuchsdauer betrug 2 Stunden.

Menge der Antikörper.

Über die Stärke der Immunsera im Vergleich zu Normalserum gibt folgende Tabelle Aufschluß.

Tabelle I.

	1,0	0,5	0,2	0,1	0,05 ccm
Prodigiosusprotease 0,1 ccm + Normalserum 1:10	±	−	−	−	−
Prodigiosusprotease 0,1 ccm + Immunserum 1:10	++	++	+	±	−
Pyocyaneusprotease 0,1 ccm + Normalserum 1:10	?	−	−	−	−
Pyocyaneusprotease 0,1 ccm + Immunserum 1:10	++	++	+	±	−

Hier wie in den folgenden Tabellen bedeutet — keine, ± schwache, + ausgesprochene, ++ starke Trübung.

In beiden Immunseren betrug also der Antiproteasegehalt etwa das Zehnfache des Normalen. Ist die Antikörpervermehrung auch nicht sehr stark, so ist doch an ihrem Vorhandensein nicht zu zweifeln.

Verhalten beim Erhitzen.

Das Pyocyaneusantiserum wurde $^1/_2$ Stunde auf 56°, 65°, 75°, 85° und 5 Minuten auf 100° erhitzt.

Tabelle II.

0,5 ccm Pyocyaneusprotease + Pyocyaneusantiserum	erhitzt auf 56°	65°	75°	85°	100°	unerhitzt
0,3 ccm	++	++	++	+	−	++
0,2 „	+	+	+	+	−	+
0,15 „	+	+	+	±	−	+
0,1 „	±	±	±	?	−	±
0,07 „	±	±	?	−	−	±
0,05 „	−	−	−	−	−	−

[1]) Kurt Meyer, diese Zeitschr. 23, 68, 1909.

Die Pyocyaneusantiprotease verträgt also $^1/_2$stündiges Erhitzen bis 75° ohne nennenswerte Einbuße ihrer Wirksamkeit. Bei 85° findet eine mäßige Abschwächung statt. Bei 100° wird sie schnell zerstört. Die Prodigiosusantiprotease verhielt sich identisch. Die Thermoresistenz entspricht somit der der meisten Antikörper.

Globulinnatur der Antiproteasen.

Bei der Fraktionierung der Antisera durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gingen die Antiproteasen nahezu quantitativ in die Globulinfraktion (Tabelle III). Auch hierbei verhalten sie sich somit wie andere Antikörper.

Tabelle III.

0,1 ccm Prodigiosusprotease +	1,0	0,5	0,2	0,1 ccm
Prodigiosusserum 1:10 . . .	++	++	+	±
Globulinfraktion ad 10 . . .	++	++	+	±
Albuminfraktion ad 10 . . .	±	−	−	−

Petrolätherextraktion.

Da das Antitrypsin des Serums bei der Äther- und Petrolätherextraktion eine geringe Einbuße seiner Wirksamkeit erfährt, woraus auf seine Lipoidnatur und damit gegen seinen Antikörpercharakter geschlossen wurde, so wurde auch das Prodigiosusserum einer sechsstündigen Extraktion mit Petroläther unterzogen. Es ergab sich hierbei ebenfalls eine geringe Abschwächung der Antiproteasenwirkung.

Tabelle IV.

0,1 ccm Prodigiosusprotease +	1,0	0,5	0,2	0,1 ccm
Prodigiosusserum 1:10 . . .	++	++	+	±
„ extrahiert .	++	+	±	?

Die Antiproteasen unterscheiden sich hierin von anderen Antikörpern, z. B. von den Hämolysinen, die, wie ich[1]) gezeigt habe, durch Extraktion mit Fettlösungsmitteln keine Einbuße ihrer Wirksamkeit erfahren. Es wäre aber verfehlt, auf

[1]) Kurt Meyer, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig. **3**, 114, 1909.

Grund dieses Verhaltens die Antikörper- oder auch nur Eiweißnatur der Antiproteasen anzuzweifeln.

Geschwindigkeit der Protease-Antiproteasebindung.

Die Hemmungswirkung des Serums erreicht sofort ihre maximale Stärke. Vorherige Einwirkung des Serums auf die Protease vor Zusatz des Caseins verstärkt die Hemmungswirkung nicht.

Tabelle V.

Prodigiosusprotease 0,1 ccm + Antiserum 1:10	1,0	0,5	0,2	0,1	0,05 ccm
Caseinlösung sofort zugesetzt .	++	++	+	±	–
„ nach 1 Stunde bei 37° zugesetzt	++	++	+	±	–

Fraktionierte Absättigung der Antiprotease durch Protease.

Bei den den Antifermenten verwandten Antitoxinen wird bekanntlich das Danyszsche Phänomen beobachtet, das darin besteht, daß eine bestimmte Menge Toxin bei fraktioniertem Zusatz eine weit größere Menge Antitoxin abzusättigen vermag als bei einmaligem Zusatz. Das gleiche Verhalten konnte ich beim Serumantitrypsin feststellen. Auffallenderweise ist das Phänomen bei den Bakterioproteasen und Antiproteasen nicht nachzuweisen (Tabelle VI).

Tabelle VI.

0,7 ccm Serum 1:10 mit 1 ccm Prodigiosusprotease versetzt.

	1,0	0,5	0,2 ccm
Auf einmal	–	±	++
fraktioniert	–	±	++

Unvollständigkeit der Protease-Antiproteasebindung.

Wie bei anderen Antigen-Antikörperreaktionen scheint auch die Absättigung der Protease durch die Antiprotease unvollständig zu verlaufen. Wie sich aus Tabelle VII ergibt, tritt auch in Gemischen, die einen erheblichen Antiproteaseüberschuß enthalten, allmählich Verdauung ein. Diese Erscheinung läßt sich wohl nur so deuten, daß geringe Mengen Protease unneutralisiert geblieben sind und allmählich doch ihre Verdauungswirkung ausüben. Es sei betont, daß bei diesen Ver-

suchen besonders auf Ausbleiben von Bakterienwachstum geachtet wurde.

Tabelle VII.

0,1 ccm Prodigiosusprotease + Immunserum	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005 ccm
Nach 2 Stunden	++	++	++	+	±	—
„ 4 „	++	++	+	±	—	—
„ 8 „	++	+	±	—	—	—
„ 24 „	+	±	—	—	—	—
„ 48 „	?	—	—	—	—	—

Reversibilität der Protease-Antiproteasebindung.

Für die Toxin-Antitoxinverbindung ist auf verschiedene Weise nachgewiesen worden, daß das Toxin in ihr in unveränderter Form enthalten ist und durch geeignetes Vorgehen wiedergewonnen werden kann. Bei der Prodigiosusprotease-Antiproteaseverbindung gelang dieser Nachweis durch Erhitzen des Gemisches auf 100°. Da, wie wir gesehen haben, die Antiprotease beim Kochen zerstört wird, die Protease aber coctostabil ist, so konnte erwartet werden, daß sich das vorher neutrale Gemisch nach dem Aufkochen als proteolytisch wirksam erwies. In der Tat war dies der Fall. Die Hemmungswirkung war nahezu aufgehoben. Daß die Verdauung keine ganz vollständige war, erklärt sich einmal durch die Abschwächung auch der Protease, sodann dadurch, daß offenbar das Serum, wenn es mit der Protease erhitzt wird, dessen Wirkung herabsetzt, und zwar in unspezifischer Weise, wie sich aus der gleichen Wirkung normalen Serums ergibt (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

0,1 ccm Prodigiosusprotease + Immunserum 1:10	0,5	0,2	0,1	0,05 ccm
Unerhitzt	++	+	±	—
5 Min. auf 100° erhitzt	+	±	±	±
5 „ „ „ „ mit Normalserum 1:10	+	±	±	±

Das Verhalten des Protease-Antiproteasegemisches erinnert an die Beobachtung Wassermanns[1]), daß ein ungiftiges Pyocyaneustoxin-Antitoxingemisch beim Erhitzen auf 100° wieder giftig wird.

[1]) Wassermann, Zeitschr. f. Hygiene 22, 263, 1896.

Spezifität der Antiproteasen.

Das Prodigiosusserum verhielt sich gegenüber der Pyocyaneusprotease wie normales Serum (Tabelle IX). Die geringen Differenzen kommen nicht in Betracht.

Tabelle IX.

	1,0	0,5	0,2 ccm
0,1 ccm Pyocyaneusprotease + Prodigiosusserum 1 : 10	+	?	–
0,1 ccm Pyocyaneusprotease + Normalserum 1 : 10	±	–	–

Die Antiproteasen sind also streng spezifisch.

Es durfte daher angenommen werden, daß sie auch gegenüber dem Pankreastrypsin unwirksam sind. Eine Identität oder überhaupt nur nahe Beziehung zum Antitrypsin war schon deswegen unwahrscheinlich, weil dieses im wesentlichen an die Albuminfraktion gebunden ist, während die Bakterien-Antiproteasen, wie oben gezeigt, mit den Globulinen ausfallen. Bei der Prüfung des Prodigiosusantiserums auf antitryptische Wirkung schien diese Erwartung zunächst getäuscht zu werden, da das Prodigiosusantiserum im Vergleich zu anderen Antiseren eine hohe antitryptische Wirkung aufwies (Tabelle X).

Tabelle X.

	1,0	0,5	0,2	0,1	0,05 ccm
Trypsin 1:500 1,0 + Prodigiosusserum 1:10	++	++	++	+	±
Trypsin 1:500 1,0 + Pferdeblutantiserum 1:10	±	–	–	–	–
Trypsin 1:500 1,0 Paratyphusantiserum 1:10	++	++	+	–	–

Es ließ sich aber leicht zeigen, daß es sich hierbei nur um ein zufälliges Zusammentreffen handelte. Antitrypsin und Antiprotease waren nebeneinander im Serum vorhanden. Dieser Nachweis gelang einmal durch Fraktionierung mit Ammonsulfat, bei der sich die antitryptische Wirkung hauptsächlich als an die Albuminfraktion gebunden erwies, während, wie oben gezeigt, die Antiprotease der Globulinfraktion angehört; sodann durch Erhitzen des Serums auf 70°, wodurch, wie oben festgestellt, die Antiprotease nicht geschädigt wird, während die antitryptische Wirkung nahezu vorschwunden war (Tabelle XI).

Tabelle XI.

	1,0	0,5	0,2	0,1	0,05 ccm
Trypsin 1:500 + Prodigiosusserum 1:10	++	++	++	+	±
Trypsin 1:500 + Globulin des Prodigiosusserums	++	±	−	−	−
Trypsin 1:500 + Albumin des Prodigiosusserums	++	++	+	±	−
Trypsin 1:500 + Prodigiosusserum 1:10, 30 Min. auf 70° erhitzt	±	−	−	−	−

Die Prodigiosusantiprotease übt also keine Hemmungswirkung gegenüber dem Pankreastrypsin aus.

Zusammenfassung.

Durch Immunisierung von Kaninchen mit Prodigiosus- und Pyocyaneusprotease lassen sich antiproteasenreiche Sera gewinnen.

Die Antiproteasen vertragen halbstündiges Erhitzen bis 75°, werden bei 85° geschädigt und bei 100° in kurzer Zeit zerstört.

Die Antiproteasen sind an die Globulinfraktion des Serums gebunden.

Durch Petrolätherextraktion wird die Antiproteasewirkung der Immunsera abgeschwächt.

Einwirkung des Serums auf die Protease vor Beginn der Verdauung verstärkt die Hemmung nicht.

Bei der Absättigung der Antiproteasen durch Protease wird das Danyszsche Phänomen nicht beobachtet.

Die Protease wird durch die Antiprotease nicht völlig gebunden, so daß auch bei Überschuß an Antiprotease noch geringe Verdauungswirkung bestehen bleibt.

Ein neutrales Protease-Antiproteasegemisch wird beim Erhitzen auf 100° wieder proteolytisch wirksam.

Die Antiproteasen sind streng spezifisch; sie hemmen weder heterologe Bakterioproteasen noch Pankreastrypsin.

Die Schlußfolgerungen, die sich aus den Eigenschaften der Anti-Bakterioproteasen bezüglich der Natur des Serumantitrypsins ergeben, sollen an anderer Stelle (Folg. scrolog. Bd. 7) gezogen werden.

Über den Zucker des Plasmas und der Blutkörperchen.

Von

R. Lépine und Boulud.

(Eingegangen am 31. März 1911.)

Nach Rona und Döblin (diese Zeitschr. 31, 215) haben Michaelis und Rona nachgewiesen, daß die roten Körperchen Zucker enthalten, und daß zwischen Plasma und Kügelchen ein Zuckeraustauch stattfindet. Diese Behauptungen sind nicht genau: C. Ludwig, dessen Schüler zu sein einer von uns die Ehre hatte, hat nie bestritten, daß die Blutkörperchen Zucker enthalten. Und die kleinen Mengen, die er darin nachgewiesen hat, bedeuten um so mehr, als die Glykolyse des Blutes durch Formelemente damals noch nicht bekannt war[1]) und dem großen Physiologen nicht als Beweisgrund dienen konnte.

Die erste Veröffentlichung von Michaelis und Rona stammt aus dem Jahre 1909. Wir haben aber schon im Jahre 1905[2]) den folgenden Fall als typisch für die Verteilung des Zuckers in den Blutkörperchen und im Plasma des normalen Hundeblutes veröffentlicht:

Für 100 g	Reduktionskraft auf Glucose berechnet
Blut	0,098 g
Plasma	0,137 g
Blutkörperchen	0,042 g

Da die Blutkörperchen 40% der Blutquantität betragen, so entfallen auf die Blutkörperchen in 100 g Blut 0,017 g Glucose, auf das Plasma 0,082 g, im ganzen 0,099 g.

[1]) Als erste auf diesem Gebiete haben sich Lépine und Barral (Compt. rend. 1891) auf die weißen Blutkörperchen bezogen: „Das Serum, meinen sie, besitzt im allgemeinen keine glykolytische Kraft. Wenn man mit Hilfe eines Hebers die verschiedenen Schichten der Blutkörperchen nach Zentrifugation von einander trennt, so ist ihre zuckerzerstörende Wirkung um so höher, je mehr weiße Körperchen sie enthalten." Die Rolle der weißen Blutkörperchen in der Glykolyse ist durch Loewy und Richter bestätigt und durch Lépine und Boulud genau bestimmt worden. Soc. de Biol. 40, 901, 20. Mai 1906.

[2]) Lépine und Boulud, Über die Verteilung der Zuckerstoffe zwischen Plasma und Blutkörperchen. Compt. rend. 41, 175, 17. Juli 1905.

Aus diesem Fall und vielen mehr oder weniger ähnlichen andern haben wir geschlossen, „daß beim normalen Hunde der Zuckergehalt der Blutkörperchen ein nicht zu vernachlässigender ist, da 100 g mindestens ein Drittel der in 100 g Plasma befindlichen Menge enthalten können, und daß unter gewissen Bedingungen, namentlich wenn die Zuckermenge plötzlich im Blute zunimmt, die Blutkörperchen, die viel Zucker einschließen, fast so viel wie das Plasma enthalten. Ja wir haben sogar, zwar in Ausnahmefällen, namentlich bei akuten Alkoholvergiftungen, gesehen, daß der Zuckergehalt der Blutkörperchen den des Plasmas übertrifft".

Den Hunden, auf die wir hinweisen, führte man auf 1 kg Lebendgewicht mittels einer Magensonde 5 bis 7 g absoluten Äthylalkohol mit dem gleichen Gewicht Wasser vermengt zu, worauf sie sofort in einen komatösen Zustand verfielen. In demselben Augenblick wurden sie zur Ader gelassen und ihrem Blute wurde Fluornatrium zugesetzt.

Da in uns die Vermutung aufgestiegen war, daß das Fluornatrium auf die Zuckerverteilung zwischen den Blutkörperchen und dem Plasma eingewirkt haben könnte, haben wir der vorstehend erwähnten Arbeit eine Reihe von Versuchen an mit Alkohol vergifteten Hunden folgen lassen, ohne Hinzufügung von Fluornatrium oder irgend einer andern Substanz zum Blut. Unter diesen Bedingungen haben wir niemals bemerkt, daß die Blutkörperchen so viel Zucker wie das Plasma enthalten. Aber da in diesem Fall immer eine mehr oder weniger starke Glykolyse in der Blutkörperchenschicht stattfand, kann man sie mit den vorhergehenden nicht in Vergleich stellen. Wenn es wahr sein sollte, daß unter bestimmten Bedingungen die Blutkörperchen wirklich mehr Zucker als das Plasma enthalten, so ist das zweifellos ein ganz vereinzelt dastehender Fall.

In einer später erschienenen Arbeit[1]) haben wir ganz besonders auf den Fehler hingewiesen, der daraus entsteht, daß während der Zentrifugation eine kleinere oder größere Zuckermenge auf Kosten des virtuellen Zuckers frei wird, so daß als Resultat die Summe des Zuckers von Plasma plus dem der Blutkörperchen fast immer erheblich größer als die Zuckermenge

[1]) Lépine und Boulud, Über den Zucker im Blutplasma. Compt. rend. 145, 742, 4. Nov. 1907.

im Blute ist. Die Hinzufügung von gerinnunghemmenden Stoffen, namentlich von Fluorsalzen zum Blute bei seinem Austritt aus dem Gefäße, vermindert zwar, verhindert aber nicht diese störende Erscheinung. Sie hat nur den Vorteil, die Glykolyse zu beschränken.

In unserer letzten Abhandlung[1]) haben wir wieder ausdrücklich das Freiwerden des Zuckers während der Zentrifugation betont, so daß man verzichten muß, die Plasmazuckermenge, obwohl sie vom physiologischen Standpunkt aus interessant zu ermitteln wäre, ganz genau festzustellen.

Die Menge ist immer um einen kleineren oder größeren Bruchteil zu groß.[2]) Dies ist natürlicherweise nicht der Fall, wenn man nicht den sogenannten Blutzucker, sondern den gesamten Zucker, in andern Worten, den gewöhnlichen Zucker plus dem virtuellen ermittelt.

Zum Schluß können wir nicht genug empfehlen, sich nicht mit Differenzbestimmungen des Zuckers in den Blutkörperchen zu begnügen. Vielmehr ist seine direkte Bestimmung zur Kontrolle unerläßlich. Zu diesem Zweck nimmt man nur die untere Schicht der Körperchen, denn in der oberen wird Zucker auf Kosten des virtuellen in erheblich höherem Maße frei. Zur Dosierung des Plasmazuckers scheint es uns zweckmäßig, nur den oberen Teil zu nehmen.

---

[1]) Lépine und Boulud, Über die Gesamtzuckermenge im Plasma und in den Blutkörperchen. Compt. rend. 149, 583, 2. Okt. 1909.

[2]) Falls nicht unter außergewöhnlichen Bedingungen, z. B. nach großen Blutungen (siehe Lépine und Boulud, Über den virtuellen Zucker. Journ. de Physiol., 5. März 1911) der virtuelle Zucker gänzlich fehlt. Das war bei dem ersten Hunde in unserer letzten Arbeit (Nr. 2781) der Fall, dessen Blutkörperchen 0,048% Glucose enthielten, d. h. fast die Hälfte des Plasmazuckers (0,106). 2 Stunden nach einem reichlichen Aderlaß haben wir bei dem sterbenden Tiere folgende (unveröffentlichte) Resultate erhalten, die wir unserem Protokollhefte entnehmen:

100 g	Reduktionskraft als Glucose berechnet
Blut	0,20 g
Plasma	0,16 g
Blutkörperchen	0,04 g

Der Zucker der Blutkörperchen bildet also nur noch ein Viertel desjenigen im Plasma, und der freigewordene Zucker ist infolge der aus virtuellem Zucker erfolgten Umbildung auf 0,2 g gestiegen. Das Fehlen des letzteren ist direkt durch die negative Reaktion nach dem Erhitzen mit Fluorwasserstoffsäure nachgewiesen worden.

Über Nebenniereninsuffizienz bei Phosphorvergiftung.

Von

E. Neubauer und O. Porges.

(Aus der I. medizin. Klinik der Universität in Wien.)

(Eingegangen am 28. März 1911.)

Eine der merkwürdigsten Stoffwechselstörungen, die bei Krankheiten und Vergiftungen beobachtet worden sind, ist der rapide Schwund des Leberglykogens bei der Phosphorvergiftung. Zwar kennt man eine ganze Reihe von physiologischen und pathologischen Zuständen, die gleichfalls zu Glykogenschwund führen. Diese unterscheiden sich aber von der Phosphorsäurevergiftung durch die Möglichkeit, durch Kohlenhydratzufuhr das Leberglykogen mit Leichtigkeit zu restituieren.

So z. B. fand Rosenfeld[1]), um hier die Vergiftungen hervorzuheben, daß die durch Phlorizin, Alkohol und Pulegonöl hervorgerufene aglykogene Fettleber durch Zuckerzufuhr unter Glykogenansatz auf den normalen Fettbestand zurückgeführt werden kann. Die einzige Intoxikation, bei der dies nicht gelang, war die Phosphorvergiftung. Eine zweite Abweichung im Kohlenhydratstoffwechsel des phosphorvergifteten Organismus im Gegensatz zu vielen sonst ähnlich wirkenden Intoxikationen zeigt der Blutzuckerbestand. Während er bei den meisten mit Glykogenschwund einhergehenden Vergiftungen erhöht ist, wurde er bei der Phosphorvergiftung von E. Neubauer[2]) normal oder herabgesetzt, von Frank und Isaac[3]) herabgesetzt oder gleich Null gefunden (vgl. auch Zusammenstellung von O. Löwi in Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden 2, 746).

Nun ist in letzter Zeit ein pathologischer Zustand beschrieben worden, der bis zu einem gewissen Grade ähnliche Anomalien des Kohlenhydratstoffwechsels darbietet, wie die Phosphorvergiftung. Es ist dies der Ausfall der Nebennierenfunktion.

---

[1]) G. Rosenfeld, Ergebnisse der Physiologie 2, 50, 1903.

[2]) E. Neubauer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 387, 1909.

[3]) Frank und Isaac, ebenda 64, 274, 1911.

Nach doppelseitiger Nebennierenexstirpation bei Hunden kommt es zu rapidem Glykogenschwund trotz Zufuhr großer Kohlenhydratmengen und gleichzeitig zu Blutzuckerschwund (Porges[1]). In ähnlicher Weise zeigt die auf Nebenniereninsuffizienz beruhende Addisonsche Krankheit herabgesetzten Blutzuckergehalt (Porges[1]). Beiden Störungen, Phosphorvergiftung und Nebennierenausfall, ist also Schwund des Leberglykogens und des Blutzuckers, also des disponiblen Kohlenhydratbestandes des Organismus gemeinsam, sowie die Unfähigkeit, aus zugeführtem Kohlenhydrat Ersatz zu schaffen. Das drängt die Vorstellung auf, daß dieser sonst nicht beobachteten Stoffwechselstörung eine gemeinsame Ursache in beiden Zuständen zugrunde liegt. Da die Phosphorvergiftung zu mannigfaltigen Organdegenerationen führt, ergab sich die Idee, die erwähnten Stoffwechselstörungen auch bei dieser auf Insuffizienz der geschädigten Nebennieren zurückzuführen. Diese Vorstellung gewinnt schon von vornherein durch einige weitere Parallelismen eine Stütze. Bekanntlich ist eines der hervorstechendsten Symptome der Nebennierenschädigung die Hypotonie, die auf Ausfall der vasokonstriktorischen Adrenalinwirkung zurückgeführt wird. Nun finden sich bezüglich der Symptomatologie der Phosphorvergiftung zahlreiche Angaben über herabgesetzten Blutdruck. So hat in Tierversuchen u. a. H. Meyer[2]) diese Beobachtung registriert. Die Klinik der menschlichen Phosphorvergiftung weiß gleichfalls über derartige Erscheinungen zu berichten (Pal[3]). Dabei ist diese Blutdrucksenkung nicht eine Folge der Herzinsuffizienz, wie man ursprünglich geglaubt hat, sondern sie ist, was besonders Pal betont, durch Insuffizienz der Vasomotoren hervorgerufen.

Somit besteht in diesem weiteren Symptome Übereinstimmung zwischen P-Vergiftung und Nebenniereninsuffizienz. Schließlich gibt es einige Beobachtungen, die bei phosphorvergifteten Menschen in den späteren Vergiftungszuständen eine auffallende Schwäche der Muskulatur verzeichnen, welche Erscheinung mit der Adynamie des Morbus Addison sowie der nebennierenlosen Hunde in Parallele gesetzt werden kann. Bei P-vergifteten Kaninchen haben wir selbst, wie Frank und Isaac, eine hochgradige Muskelschwäche gesehen, deren Auffassung als Adynamie als unbeweisbar erscheint, insofern als sich bei diesen temperamentlosen Tieren diese Erscheinung von einem gewöhnlichen Schwächezustand nicht unterscheiden läßt.

---

[1]) O. Porges, Zeitschr. f. klin. Med. 69, 341, 1909 u. 70, 243, 1910.

[2]) H. Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 14, 313, 1882.

[3]) J. Pal, Jahrb. d. Wiener k. k. Krankenanstalten II. T., 1, 1895; Wiener klin. Wochenschr. 1896, Nr. 44, S. 999; Wiener klin. Rundschau 1899, Nr. 15, S. 229.

Um für unsere Annahme weitere Stützen zu gewinnen, stellten wir uns die Aufgabe, zunächst den Einfluß der P-Vergiftung auf die Nebenniere zu untersuchen.

I.

Über die Nebenniere phosphorvergifteter Menschen oder Tiere liegen keine ausreichenden Beobachtungen vor. Nur Luksch[1]) hat in einem Versuch bei einem phosphorvergifteten Kaninchen Fehlen der blutdrucksteigernden Substanz im Nebennierenextrakt festgestellt. Da ein ähnlicher Befund von diesem Autor bei einer ganzen Reihe von Vergiftungen und Krankheiten erhoben worden ist, überdies bei P-Vergiftung nur dieser eine Versuch vorliegt, so war es geboten, festzustellen, ob Nebennierenveränderungen einen konstanten, charakteristischen Befund der P-Vergiftung darstellen.

Unsere Versuche wurden an Kaninchen ausgeführt. Der P wurde als ein $^1/_2\,^0/_0$iges Phosphoröl subcutan injiziert. Auf der Höhe des Krankheitsbildes wurden die Tiere durch Nackenschlag oder Verblutung getötet, die Nebenniere in Müller-Formollösung eingelegt, deren Einwirkung mindestens 14 Tage ausgesetzt, dann mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Einige Versuche beziehen sich auch auf Nebennieren, die unmittelbar nach spontanem Exitus entnommen waren. In gleicher Weise wurden Kontrolluntersuchungen an normalen, im übrigen unter gleichen Lebensbedingungen gehaltenen Kaninchen ausgeführt. Während bei diesen letzteren schon makroskopisch und dementsprechend mikroskopisch Chromfärbbarkeit des Markes festzustellen war, ließ sich in dem Nebennierenmarke bei phosphorvergifteten Tieren meist keine, mitunter eine ganz geringe, augenfällig unter der Norm liegende Chromfärbung beobachten. In einigen Fällen untersuchten wir auch im wässerigen oder alkoholischen Extrakt der Nebennieren[2]) von P-Tieren mit der Jod- und Eisenchloridreaktion auf Adrenalin: mit negativem Resultat. Das nähere ergeben nachstehende Versuchsprotokolle.

[1]) Luksch, Wiener klin. Wochenschr. 1904, 345.

[2]) Der Extrakt war genau nach dem Vorgange von Battelli*) hergestellt. In Kontrollversuchen an normalen Nebennieren überzeugten wir uns von der Brauchbarkeit dieser Extraktionsmethode. Ebenso ergaben Kontrollversuche unter Hinzufügung von Spuren von Adrenalin zu negativ reagierenden Extrakten positive Adrenalinreaktion.

*) Battelli, Compt. rend. Soc. Biol. 54, 928, 1902.

Normaltiere.

18. XII. 1909. Kaninchen, 3100 g, hungert bis 21. XII. Durch Nackenschlag wird es getötet. Im Nebennierenmarke schon makroskopisch reichlich chromgebräunte Substanz.

19. II. 1910. Kaninchen, 2900 g, hungert 2 Tage. Im Nebennierenmarke reichlich chromgefärbte Substanz.

Phosphortiere.

18. XII. 1909. Kaninchen, 3300 g, erhält in zwei Dosen 0,04 g Phosphor. Nach 60 Stunden Exitus. Fettleber. Im Nebennierenmarke nur in einzelnen Schnitten mikroskopisch wenig gefärbte chromaffine Substanz. Die Jod- und Eisenchloridreaktion auf Adrenalin im wässerigen Extrakt fiel negativ aus.

18. XII. 1909. Kaninchen, 1200 g, erhält in zwei Dosen 0,02 g Phosphor. Nach 60 Stunden tot gefunden. Jod- und Eisenchloridreaktion auf Adrenalin im wässerigen Extrakt negativ.

18. XII. 1909. Kaninchen, 3100 g, erhält in drei Dosen 0,06 g Phosphor. Nach 96 Stunden wird es durch Verbluten aus der Carotis getötet. Fettleber. Jod- und Eisenchloridproben auf Adrenalin im wässerigen Nebennierenextrakt negativ.

12. I. 1910. Kaninchen, 3500 g, erhält in drei Dosen 0,05 g Phosphor. Nach 96 Stunden wird das Tier durch Nackenschlag getötet. Typische Fettleber. Im alkoholischen Extrakt der Nebennieren fällt die Jodreaktion negativ aus.

29. III. 1910. Kaninchen, 3000 g, erhält in einer Dosis von 0,0075 g Phosphor (ferner 50 g Traubenzucker in zwei Gaben). Nach 78 Stunden wird es durch Verbluten aus der Carotis getötet. Typische Fettleber. In beiden Nebennieren keine Spur von Chromfärbung.

1. XI. 1910. Kaninchen, 1500 g, erhält 0,005 g Phosphor in zwei Dosen. Nach 124 Stunden wird das sehr schwache Tier durch Nackenschlag getötet. Geringe Mengen chromaffiner Substanz vorhanden.

21. XI. 1910. Kaninchen, 2700 g, erhält in zwei Dosen 0,0105 g Phosphor (ferner 60 g Hafermehl in drei Gaben). Nach 75 Stunden Exitus. In der Nebenniere keine chromaffine Substanz.

21. XI. 1910. Kaninchen, 2700 g, erhält in zwei Dosen 0,0105 g Phosphor (ferner 60 g Weizenmehl). Nach 75 Stunden durch Nackenschlag getötet. Typische Fettleber. Keine Chromfärbbarkeit.

19. II. 1910. Kaninchen, 3400 g, erhält in einer Dosis 0,034 g Phosphor und wiederholt 1‰ige Adrenalinlösung subcutan. 32 Stunden nach Beginn der Vergiftung Exitus. Typische Fettleber. Keine Chromfärbbarkeit.

15. III. 1910. Kaninchen, 3650 g, erhält nach Vorbehandlung mit Adrenalin (s. unten, vgl. Versuch Nr. 3) 0,0175 g Phosphor in zwei Dosen (und 40 g Dextrose in zwei Gaben). Nach 56 Stunden Exitus.

Fettleber. Eine Nebenniere zeigt Spuren, die andere keine chromaffine Substanz.

6. II. 1910. Kaninchen, 3000 g, erhält 0,03 g Phosphor in zwei Dosen (und Adrenalin s. unten, vgl. Versuch Nr. 6). Nach 60 Stunden wird das Tier tot gefunden. Fettleber. Keine Chromfärbbarkeit.

11. II. 1910. Kaninchen, 2800 g, erhält (nach Vorbehandlung mit Adrenalin, vgl. Versuch Nr. 1) 0,0205 g Phosphor in zwei Dosen. Nach 68 Stunden wird das Tier tot gefunden; Leber nicht fett, keine Chromfärbbarkeit.

11. II. 1910. Kaninchen, 2700 g, erhält (nach Vorbehandlung mit Adrenalin, vgl. Versuch Nr. 2) 0,0215 g Phosphor in zwei Dosen. Nach 83 Stunden wird das sehr schwache Tier durch Nackenschlag getötet; Leber nicht fett. Chromfärbbarkeit geringen Grades.

1. XI. 1910. Kaninchen, 1400 g, erhält (nach Vorbehandlung mit Adrenalin) 0,0058 g Phosphor. Nach 122 Stunden Exitus. Im Nebennierenmarke Chromfärbbarkeit geringen Grades.

II.

Es zeigt sich also, daß die P-Vergiftung die Chromfärbbarkeit des Nebennierenmarkes aufhebt. Wir haben demnach bei dieser Vergiftung einen Funktionsausfall speziell des Nebennierenmarkes zu erwarten. Als physiologisch wirksame Substanz des Nebennierenmarkes gilt das Adrenalin. Das Adrenalin hat eine spezifische Einwirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel sowie auf den Blutdruck. Es erzeugt Hyperglykämie [Metzger[1]) u. a.] sowie Neubildung von Glykogen (Pollak[2]). Bei der P-Vergiftung finden wir Hypoglykämie und Glykogenschwund. Das Adrenalin erzeugt ferner Blutdrucksteigerung. Bei der P-Vergiftung finden wir Hypotension. Damit erscheint es gegeben, die Anomalie des Kohlenhydratstoffwechsels und des Blutdrucks bei der P-Vergiftung auf Ausfall der Adrenalinwirkung zu beziehen, zumal da in einigen unserer Versuche die Abwesenheit von Adrenalin in der Nebenniere direkt festgestellt wurde.

Diese Schlußfolgerung könnte erhärtet werden, wenn es gelange, durch Zufuhr des fehlenden Adrenalins die auf dessen Ausfall zu beziehenden Störungen der P-Vergiftung aufzuheben. Nun ist freilich die gebräuchliche subcutane Zufuhr von käuflichem Adrenalin, selbst wenn in Zwischenräumen von nur wenigen Stunden ausgeführt, in ihrem Effekt nicht gleich-

[1]) Metzger, Münchner med. Wochenschr. 1902, 478.

[2]) L. Pollak, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 149, 1909.

bedeutend mit der Art, in der der lebende Organismus sein Adrenalin (oder vielleicht eine ähnlich wirkende Substanz) erhält.[1]) Gelingt es doch auch nicht, entnebennierte Tiere durch Adrenalinzufuhr zu erhalten. Um so mehr ist selbst ein teilweiser Erfolg der subcutanen Adrenalinzufuhr beweiskräftig.

Zu unseren Versuchen dienten kräftige Kaninchen. Das Adrenalin wurde bis zu 5mal täglich in wechselnden Mengen zugeführt. In einem Teil der Versuche waren die Tiere bereits vor der P-Vergiftung mit Adrenalin vorbehandelt worden, weil auf diese Art die Adrenalinglykosurie beseitigt und nach den Versuchen Pollaks[2]) die Glykogenbildung erst durch andauernde Adrenalingewöhnung herbeigeführt wird. Die Tiere wurden auf der Höhe der Vergiftung in einem Zeitstadium, in regelmäßig hochgradige Fettleber und Aglykogenie gefunden wird, durch Nackenschlag getötet, die sofort entnommene Leber gewogen und ein Teil zur Glykogen-, ein anderer zur Fettbestimmung verwendet. Ein großer Teil der Tiere ging spontan ein, so daß die hier gefundenen Werte an Glykogen bei der Labilität desselben post mortem, Minimalwerte darstellen.

Die Glykogenbestimmung wurde folgendermaßen ausgeführt: Nach dem bekannten Verfahren Pflügers[3]) wurde ein gewogenes Leberstück mit Kalilauge mehrere Stunden lang gekocht, das Glykogen hernach gefällt und gewaschen, hierauf gelöst und die Lösung nach dem Verfahren von Neubauer und Porges[4]) mit so viel Rhodankalium aufgehellt, daß ihr Volumen sich verdoppelte. Die geklärte, noch durch ein Faltenfilter geschickte Lösung wurde polarimetrisch untersucht.

Zur Fettbestimmung wurde ein gewogenes Stück Leber in kleine Teilchen zerschnitten, mit 96%igem Alkohol tagelang bei Zimmertemperatur digeriert, hierauf der Alkoholauszug abfiltriert, eingedampft, der Rückstand in Äther aufgenommen. Die von dem Alkoholauszug abfiltrierten Gewebsstücke wurden mit Seesand verrieben, im Soxhlet bis zur Erschöpfung mit Äther extrahiert, der Ätherauszug mit der ätherischen Lösung des Alkoholextraktes vereinigt, eingedunstet und im Wärmeschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

---

[1]) Eine Anordnung, die Kretschmar angegeben hat, nämlich die intravenöse Dauerinfusion käme wohl den physiologischen Verhältnissen am nächsten, war aber für unsere tagelang währenden Versuche nicht anwendbar.

[2]) Pollak l. c.

[3]) Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol. 96, 1, 1903.

[4]) Neubauer und Porges, Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels 1910.

Versuch 1.

Kaninchen, 2800 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
11. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,001	Kohl, Rüben		
12. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,002	„ „		
13. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,003	„ „		
14. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,004	„ „		
	$6^1/_2{}^h$ p. m.		0,001			
15. II.	8^h a. m.		0,002	Hunger	Zucker +	Gew.: 2150 g
	11^h a. m.	0,0105				
	12^h m.		0,001			
16. II.	7^h a. m.		0,002	„		
	12^h m.		0,002			
	10^h p. m.		0,004			
17. II.	7^h a. m.		0,002	„		
	11^h a. m.	0,01				
	12^h m.		0,002			Kein Harn zu gewinnen
	6^h p. m.		0,004			Sehr schlaff
18. II.	8^h a. m.			„		Tot gefunden, noch warm

Lebergewicht 97 g. Glykogen 1,404% = 1,36 g. Fett 3,50%.
Nebennieren: keine Chromfärbbarkeit.

Versuch 2.

Kaninchen, 2700 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
11. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,001	Kohl, Rüben		
12. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,002	„ „		
13. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,003	„ „		
14. II.	$7^1/_2{}^h$ a. m.		0,004	„ „		
	$6^1/_2{}^h$ p. m.		0,001			
15. II.	8^h a. m.		0,002	Hunger	Zucker +	Gew.: 2350 g
	11^h a. m.	0,0115				
	12^h m.		0,001	„		
16. II.	7^h a. m.		0,002	„		
	12^h m.		0,002			
	10^h p. m.		0,004			
17. II.	7^h a. m.		0,002	„		
	11^h a. m.	0,01				
	12^h m.		0,002			
	10^h p. m.		0,004			
18. II.	7^h a. m.		0,002	„		
	1^h p. m.		0,003		Zucker 0	

Versuch 2 (Fortsetzung).

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
18. II.	6h p. m. 10h p. m.	0,001		Hunger	Aceton 0	Sterbend, durch Nackenschlag getötet

Gewicht des toten Tieres 2000 g. Im Harn Zucker negativ. Lebergewicht 79 g. Glykogen 0,05‰ = 0,039 g. Fett = 3,123%. Nebennieren: Chromfärbbarkeit mäßigen Grades.

Versuch 3.

Kaninchen, 3650 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
15. III.	7h a. m.		0,002	Hunger		
16. III.	7h a. m.		0,003	„		
17. III.	7h a. m.		0,004	„		
18. III.	7h a. m.		0,002	„		
	11h a. m.	0,0125				
	10h p. m.		0,002			
19. III.	7h a. m.		0,002			
	11h a. m.			20 g Traubenzucker in 100 ccm Wass.	Zucker neg. Aceton neg.	
	5h p. m.				Zucker+, wen.	
	8h p. m.		0,002			
20. III.	7h a. m.		0,002	„	Zucker neg.	
	11h a. m.					
	4h p. m.		0,0015		Zucker+, wen. Aceton neg.	matt
	4½h p. m.	0,0025				
	7½h p. m.					Exitus

Gewicht des toten Tieres 3000 g. Lebergewicht 145 g. Glykogen 0,31% = 0,4495 g. Fett 8,074%. Nebennieren: keine Chromfärbbarkeit der einen Nebenniere, die der anderen angedeutet.

Versuch 4.

Kaninchen, 2700 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
9. II.	12h m.	0,0135	0,001	Hunger		
	4h p. m.		0,001			
	10h p. m.		0,001			

Versuch 4 (Fortsetzung).

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
10. II.	7h a. m.		0,0015	Hunger		
	12h m.		0,0015			
	10h p. m.		0,002		Zucker +	
11. II.	7h a. m.					Das Tier wird morgens tot gefunden

Gewicht des toten Tieres 2200 g. Im Blasenharn viel Zucker, kein Aceton. Lebergewicht 110 g, Glykogen 0, Fett 2,937%. (Um 11h a. m. verarbeitet.)

Versuch 5.

Kaninchen, 3700 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
9. II.	12h m.	0,0185	0,001	Hunger		
	4h p. m.		0,001			
	10h p. m.		0,001			
10. II.	7h a. m.		0,0015	„		
	12h m.		0,0015			
	10h p. m.		0,002		Zucker +	
11. II.	7h a. m.		0,002			
	12h m.				Zucker stark +	
	10h p. m.	0,01	0,003			
12. II.						Das Tier wird morgens tot gefunden

Lebergewicht 114 g. Glykogen 0,444% = 0,5195 g. Fett 1,706%.

Versuch 6.

Kaninchen, 3000 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
6. II.	10h a. m.	0,02		Hunger		
7. II.	12h m.		0,001	„		
	10h p. m.		0,001			
8. II.	11h a. m.	0,01	0,001	„	Zucker +	
	9h p. m.					Tier tot gefunden

Mehrere Stunden nach dem Tode untersucht: Typische Fettleber.

Versuch 7.

Kaninchen, 3200 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
2. IV.	11h a. m.	0,008		Hunger		
	4h p. m.		0,002			
3. IV.	7h a. m.		0,002	„		
	12h m.			25 g Dextrose in 100 ccm Wasser	Zucker +	
	10h p. m.		0,002			
4. IV.	10h a. m.		0,002	Hunger	Zucker + Aceton 0	
	12h m.			25 g Dextrose in 100 ccm Wasser		
	6h p. m.		0,002			
	12h m.		0,002		Zucker +	
5. IV.	7h a. m.					Morgens tot gefunden

Leber um 9h a. m. verarbeitet (einige Stunden nach dem Tode). Leberglykogen 0. Fett 4,69%.

Versuch 8.

Kaninchen, 2800 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
2. IV.	11h a. m.	0,007		Hunger		
	4h p. m.		0,002			
3. IV.	7h a. m.		0,001	„		
	12h m.			25 g Dextrose in 100 ccm Wasser	Zucker +	
	6h p. m.		0,0005			
	10h p. m.		0,0005			
4. IV.	10h a. m.					Exitus

Gewicht des toten Tieres 2800 g. Im Blasenharn viel Zucker, kein Aceton. Lebergewicht 85 g. Glykogen 0. Fett 5,71%.

Versuch 9.

Kaninchen, 3100 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
1. III.	6h p. m.		0,002	Kohl, Rüben		
2. III.	12h m.		0,002	„ „	Zucker stark positiv	

Versuch 9 (Fortsetzung).

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
3. III.	11h a. m.		0,003	Kohl, Rüben	Zucker neg.	
	6h p. m.				Zucker stark positiv	
4. III.	11h a. m.		0,004	„ „	Zucker neg.	
5. III.	11h a. m.		0,004	„ „	„ „	Gew. 2770 g
	4h p. m.				Zucker stark positiv, Aceton neg.	
6. III.	11h a. m.	0,014	0,004	Hunger		Gew. 2800 g
7. III.	11h a. m.		0,004	„	Anurie?	
	8h p. m.		0,004			elend
	9½h p. m.					durch Nackenschlag getötet

Gewicht des toten Tieres 2650 g. In der Blase ein Tropfen Harn, Reduktion 0. Leber 95 g. Glykogen Spuren. Fett 5,55%.

Versuch 10.

Kaninchen, 3400 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
19. II.	10h a. m.	0,034		Hunger		
20. II.	7h a. m.		0,002			
	11h a. m.		0,003			
	10h p. m.		0,004			
21. II.	11h a. m.		0,005		Zucker neg., Aceton neg.	Erregung
	5h p. m.		0,004		Zucker? (geringe Red.)	„
	7½h p. m.					Exitus

Gewicht des toten Tieres 3000 g. Lebergewicht 140 g. Glykogen Spuren. Fett 10,13%. Nebennieren: keine Chromfärbbarkeit.

Kontrollversuch.

Versuch 11.

Kaninchen, 3000 g.

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
29. III.	11½h a. m.	0,0075		Hunger		
30. III.	12h m.			25 g Dextrose in 100 ccm Wasser		

Versuch 11 (Fortsetzung).

Datum 1910	Tageszeit	Phosphordosis g	Adrenalindosis g	Fütterung	Harnbefund	Anmerkungen
31. III.	12h m.			25 g Dextrose in 100 ccm Wasser	Zucker neg., Aceton neg.	
1. IV.	11h a. m.				geringe Red. Zucker?	
	12h m.			25 g Dextrose in 100 ccm Wasser		
	6h p. m.					matt, durch Verbluten aus der Carotis getötet

Gewicht des toten Tieres 3000 g. Lebergewicht 77 g. Glykogen 0. Fett 9,6156%. Nebennieren: Chromfärbbarkeit 0.

Aus den Versuchsprotokollen wollen wir zunächst die Versuche Nr. 1, 2, 3 und 5 herausgreifen. In diesen Versuchen fand sich in der Leber eine gewisse Glykogenmenge bei normalem oder wenig erhöhtem Fettgehalte. Es fragt sich nun, wie dieses Ergebnis, das eine Abweichung von der gewöhnlichen Einwirkung der P-Vergiftung auf die Leber zeigt, zu deuten ist. Es könnte zunächst vermutet werden, daß die P-Vergiftung nicht intensiv und lange genug eingewirkt hätte. Ziehen wir zum Vergleiche die Versuche von Neubauer heran, sowie, um alle Einwände, etwa Rassen- oder Jahreszeiteneinfluß, auszuschalten, einen eigenen ad hoc ausgeführten, so erkennen wir, daß die Dosis von 0,0025 g P (trotz Traubenzuckerzufuhr) innerhalb des Zeitraumes von 3 Tagen regelmäßig zu der typischen Erscheinung einer aglykogenen Fettleber führt. Somit ist das Ausbleiben dieser Erscheinung in unseren Versuchen als Folge der Adrenalinzufuhr zu deuten. Nun könnte das Adrenalin und der Hungerzustand zu einer wesentlichen Reduktion des Fettbestandes geführt und auf diese Art das Ausbleiben der Fettleber verursacht haben, da nach den Untersuchungen von Leisering[1]), Lebedeff[2]) und Rosenfeld[3]) bei fettfreien Tieren

[1]) Leisering, Virchows Archiv 30, 478, 1864.
[2]) Lebedeff, Arch. f. d. ges. Physiol. 31, 11, 1883.
[3]) G. Rosenfeld, l. c.

durch P-Vergiftung keine Leberverfettung auftritt. Einige unserer Tiere zeigten eine erhebliche Gewichtsabnahme, bei anderen jedoch scheint diese Deutung nicht zulässig zu sein, da die hier beobachtete Gewichtsreduktion nicht erheblicher ist, als sie sonst bei Vergiftungen beobachtet wurde. Jedenfalls aber kann das Vorhandensein von Glykogen nur eine direkte, von der Gewichtsabnahme unabhängige Adrenalinwirkung sein, da ja die Einbuße an Körpermaße sonst eher zu Glykogenreduktion führt. Wir glauben somit zu der Schlußfolgerung berechtigt zu sein, daß das Adrenalin die durch die P-Vergiftung verursachte Störung des Glykogenstoffwechsels behoben hat.

Eine weitere Erscheinung, die auf eine Einwirkung des Adrenalins auf den Kohlenhydratstoffwechsel der phosphorvergifteten Tiere schließen läßt, ist die in vielen unserer Versuche beobachtete Glucosurie. Da die Glucosurie auf vorhergehende Hyperglykämie schließen läßt, so ergibt sich, daß das Adrenalin die durch P-Vergiftung herbeigeführte Hypoglykämie paralysiert.[1]) Somit ist das Adrenalin hinsichtlich des Kohlenhydratstoffwechsels ein vollständiger Antagonist der P-Vergiftung; Adrenalin bildet Glykogen und Zucker, die P-Vergiftung führt zum Schwund vom Glykogen und Blutzucker.

Unseren positiven Versuchen stehen aber eine Anzahl negativer gegenüber, in denen es nicht gelang, die Folgen der P-Vergiftung, Fettleber und Aglykogenie hintanzuhalten (Nr. 6, 7, 8, 9 und 10). Dieser scheinbare Mißerfolg läßt sich aber durch folgende Überlegungen aufklären.

1. Die Applikationsart und die Dosierung des Adrenalins ist eine den physiologischen Verhältnissen wenig entsprechende. Während der Organismus kontinuierlich kleine Adrenalinmengen

---

[1]) Frank und Isaac (l. c.) haben im letzten Stadium P-vergifteter Tiere nach Adrenalinzufuhr keine Hyperglykämie feststellen können, was sie zu der Schlußfolgerung veranlaßt, daß die Leberzellen nicht mehr auf Adrenalin reagieren. Da aber, wie unsere Versuche ergeben, das vom Organismus in den Nebennieren gebildete Adrenalin in Wegfall kommt, so ist eine höhere Injektionsmenge von Adrenalin erforderlich, um die wirksame Dosis zu erreichen. Demgemäß haben wir durch Injektion eines Adrenalinüberschusses noch eine Glucosurie erzielt; es waren also die Tiere noch zur Kohlenhydratproduktion fähig.

zufließen läßt, haben wir in Intervallen größere Adrenalinmengen einverleibt. So kann es geschehen, daß der Organismus zeitweise an Adrenalin Mangel leidet und die Folgen dieses Mangels eintreten, zeitweise ein Adrenalinüberschuß eventuell Entleerung vorhandenen Glykogens als Zucker und konsekutive Fetteinwanderung in die Leber bewirkt. Damit wäre z. B. der Mißerfolg in dem Versuche Nr. 9 zu erklären, in dem große Adrenalindosen in großen Intervallen gegeben wurden.

Demgemäß zeigen diejenigen Versuche den günstigsten Effekt der Adrenalinwirkung, in denen möglichst oft kleine Dosen einverleibt wurden, und außerdem das Tier durch der P-Vergiftung vorangehende Adrenalininjektion an die toxische Wirkung des Adrenalins gewöhnt worden war.

2. Vielfach wurde die Leber nach spontanem Exitus entnommen, vorhandenes Glykogen konnte bereits zersetzt sein. Speziell ist etwas derartiges für die Versuche, in denen vor dem Exitus Glucosurie beobachtet wurde und die nach dem Tode entnommene Leber sich als fettarm erwies, anzunehmen (Vers. Nr. 4).

3. In einigen Versuchen war das Tier gegen die glucosurische Wirkung des Adrenalins noch nicht immun, das Fehlen von Leberglykogen erklärt sich durch vorangehende Ausschüttung als Zucker, die ev. vorhandene Fettleber ist ev. als Folge dieser Glykogenentleerung aufzufassen (Vers. Nr. 6, 7 und 8).

4. In einem unserer Versuche ist wohl die zu hohe Phosphordosis für das Ausbleiben der Adrenalinwirkung verantwortlich zu machen (Vers. Nr. 10).

Aber abgesehen von derartigen Möglichkeiten ist ein positiver Versuch mit Rücksicht auf die Fragestellung beweisender als ein negativer. Sofern man als das Charakteristische der P-Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel den Kohlenhydratschwund bezeichnet, wurde durch Adrenalin diese Wirkung in der Mehrzahl der Versuche aufgehoben, da entweder noch bis zum Exitus Glucosurie oder nach dem Exitus Leberglykogen beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse unserer Versuche lassen sich also folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die P-Vergiftung hebt die Chromfärbbarkeit der Marksubstanz der Nebenniere auf. Dieser Ausfall geht einher mit

gestörter Funktion der Marksubstanz, speziell mit Ausfall der Adrenalinbildung.

2. Durch Adrenalinzufuhr läßt sich die zu Kohlenhydratschwund und Fettleber führende Wirkung der P-Vergiftung oft paralysieren.

Konstruieren wir aus diesen Tatsachen einen Zusammenhang, so gelangen wir zu der Schlußfolgerung, die unseren Versuchen als Leitidee diente. Ein Teil der Stoffwechselstörung der P-Vergiftung ist durch Ausfall der Nebennierenfunktion speziell durch mangelnde Adrenalinbildung verursacht. Der Kohlenhydratschwund (Aglykogenie der Leber, Hypoglykämie) sowie die Fettleber kommen auf dem Wege einer Schädigung des adrenalinproduzierenden Nebennierenmarkes durch die P-Vergiftung zustande.

Diese Theorie weicht von den bisherigen Anschauungen wesentlich ab. Denn bisher nahm man an, daß die erwähnten Störungen eine Folge der Schädigung der Leberzellen durch den P darstellen. Diese Anschauung wird durch Tatsachen gestützt, die wirklich eine Schädigung der Leberzellen durch P erkennen lassen. Abgesehen von morphologischen Befunden wären hier zahlreiche Stoffwechselstörungen, die auf geschädigte Leberfunktion hinweisen, anzuführen, so die Ausscheidung von Amidosäuren und von Milchsäure im Urin. So glauben auch Frank und Isaac[1]) den Kohlenhydratschwund bei P-Vergiftung auf Schädigung der Leberzellen zurückführen zu können; sie stützen sich im wesentlichen auf einige ihrer Versuche, die nach ihrer Ansicht ein Unvermögen der P-vergifteten Tiere, nach Adrenalinzufuhr Zucker zu produzieren, ergeben haben. Aber abgesehen davon, daß auch ihre Versuchstiere wenigstens einen höheren Blutzuckerwert ergeben haben, als ihn die nicht mit Adrenalin behandelten Tiere erkennen lassen, zeigte sich in unseren Versuchen infolge reichlicherer Adrenalinzufuhr Glucosurie, somit keine Störung der Leberzellen in dem von Frank und Isaac angenommenen Sinne. Wie wir schon ausgeführt haben, ist nur die Reizschwelle des Adrenalins bei der P-Vergiftung erhöht, vermutlich aus demselben Grunde wie beim nebenniereninsuffizienten Organismus. So haben auch Eppinger,

[1]) Frank und Isaac, l. c.

Falta und Rudinger[1]) sowie Pollak[2]) beim Morbus Addison durch eine beim normalen stets zu Glucosurie führende Adrenalinmenge keine Glucosurie zu erzeugen vermocht. Die Ursache dieses Ausfalls ist auch hier keine Leberschädigung, sondern mangelhafte Adrenalinbildung der Nebennieren. Glauben wir somit die Argumentation von Frank und Isaac ablehnen zu können, so soll dennoch durchaus nicht in Abrede gestellt werden, daß eine Leberschädigung beim Zustandekommen der aglykogenen Fettleber eine gewisse Rolle spielen könnte.[3])

Welche Gesichtspunkte ergeben nun unsere Versuche für die Theorie der P-Vergiftung sowie für ihre klinische Symptomatologie und Therapie?

Es ist anzunehmen, daß durch die P-Vergiftung nicht nur die Marksubstanz der Nebenniere, sondern das ganze chromaffine System getroffen wird. Die P-Vergiftung käme also einer Ausschaltung des gesamten chromaffinen Systems gleich. Die Nebennierenexstirpation bei Hunden führt zu Abfall des Blutzuckers [Porges[4])], während bei Kaninchen nach Frank und Isaac[5]) diese Erscheinung erst sub finem vitae zu beobachten ist. Diese Differenzen glaubte nun Porges dadurch erklären zu können, daß die Kaninchen im Gegensatz zu Hunden außerhalb der Nebennieren hinreichende Mengen chromaffinen Gewebes besitzen. Wird nun durch P-Vergiftung das gesamte chromaffine System außer Tätigkeit gesetzt, so muß auch be Kaninchen Blutzuckerschwund auftreten. In der Tat haben nun Frank und Isaac in dem letzten Stadium der P-Vergiftung vollständigen Schwund des Blutzuckers bei P-vergifteten Kaninchen beobachtet.

---

[1]) Eppinger, Falta und Rudinger, Zeitschr. f. klin. Med. 67, 380, 1909.

[2]) L. Pollak, Wiener med. Wochenschr. 1910, Nr. 15, S. 866.

[3]) Die oxydativen Funktionen der Leber scheinen übrigens durch P-Vergiftung nicht erheblich geschädigt zu werden. Wenigstens haben wir in nicht publizierten Versuchen bei Durchblutung der überlebenden Leber P-vergifteter Hunde aus Buttersäure Acetonbildung in normalem Ausmaße festgestellt.

[4]) Porges, l. c.

[5]) Frank und Isaac, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 7, 326, 1910.

Als unmittelbare Todesursache, wenigstens der akutesten P-Vergiftung, gilt die Herzdegeneration. Aber schon H. Meyer[1]) fand im Herzmuskel seiner P-Tiere verhältnismäßig geringfügige Veränderungen, die den Tod nicht erklären konnten, und er machte eine Lähmung des Herznervensystems verantwortlich.

Die Symptome der Kreislaufstörung, die beobachtete Hypotonie und Tachykardie konnten aber außer durch Herzlähmung auch durch Vasomotorenlähmung verursacht sein. Meyer ventilierte diese Möglichkeit, lehnte sie aber ab, da er bei seinen Tieren durch Asphyxie noch Blutdrucksteigerung erzeugen konnte. Ist nun nach diesem Ergebnis eine periphere Vasomotorenlähmung auszuschließen, so könnte man doch an einen herabgesetzten Tonus der Vasomotoren denken, ähnlich wie er bei Nebenniereninsuffizienz besteht, deren Hypotonie unter anderem durch Adrenalininjektion zu beheben ist. Pal[2]) nimmt bereits zu einer Zeit, zu der an einen Zusammenhang zwischen P-Vergiftung und Nebenniereninsuffizienz nicht gedacht werden konnte, dahin Stellung, daß er die Kreislaufsymptome der P-Vergiftung als Vasomotoreninsuffizienz auffaßt, ja er schlägt sogar zu deren Behebung Injektion von Nebennierenextrakt vor. Unsere Versuche beseitigen einen jeden Zweifel darüber, daß die Blutdrucksenkung vasculären und nicht kardialen Ursprungs ist. Dementsprechend können wir uns mit Bewußtsein des kausalen Zusammenhanges dem Vorschlag von Pal, Adrenalin behufs Bekämpfung der Kreislaufschwäche bei der P-Vergiftung anzuwenden, anschließen.

Ein weiteres Symptom der P-Vergiftung, die Hypothermie, läßt sich ebenfalls zwanglos auf Nebenniereninsuffizienz zurückführen, denn auch bei Morbus Addison sowie bei experimenteller Nebennierenausschaltung ist von vielen Seiten Hypothermie beobachtet worden. Vielleicht steht dieses Symptom im Zusammenhang mit einer weiteren Erscheinung, die beiden pathologischen Zuständen gemeinsam ist, der Adynamie. Die als Adynamie bezeichnete Muskelschwäche bei Morbus Addison hat Porges[3]) auf den Mangel an Blutzucker zurückgeführt, und

[1]) H. Meyer, l. c.
[2]) Pal, l. c.
[3]) Porges, l. c.

Frank und Isaac[1]) schließen sich dieser Betrachtungsweise insofern an, als sie die Asthenie ihrer P-vergifteten Tiere als Folgen der Hypoglykämie ansehen. Eine richtige Adynamie bei P-Vergiftung finden wir klinisch nirgends beobachtet, wohl weil die vielfach verzeichnete Muskelschwäche zu Symptomen des Nervensystems (Koma usw.) in Abhängigkeit gebracht wird. Fassen wir jedoch die Hypothermie als mangelhafte chemische Wärmeregulation im Sinne Rubners auf, dann ist auch die Muskelschwäche der P-Vergiftung mit der Adynamie der Nebenniereninsuffizienz in Parallele zu setzen.

Die erwähnten Beziehungen zwischen Muskelschwäche und Kohlenhydratmangel geben uns auch eine symptomatische Therapie an die Hand. Bei Morbus Addison ist eine Bekämpfung der Adynamie durch reichliche Kohlenhydratzufuhr vorgeschlagen und zum Teil auch mit Erfolg versucht worden [Porges[2]), Gautrelet[3]), Porges und Tedesko[4])]. Ähnlich ließe sich eine symptomatische Besserung durch reichliche Kohlenhydratfütterung bei der P-Vergiftung erwarten. Speziell wäre hier die Zufuhr von Lävulose zu versuchen, da nach Versuchen von E. Neubauer[5]) Lävulose beim P-vergifteten Tiere noch Glykogenansatz bewirkt.[6]) Übrigens scheint aus Neubauers Versuchen bereits eine lebensverlängernde Wirkung der Kohlenhydratzufuhr hervorzugehen.

---

[1]) Frank und Isaac, l. c.

[2]) O. Porges, l. c.

[3]) Gautrelet, Compt. rend. Soc. Biol. 1910.

[4]) Porges und Tedesko, nicht publiziert.

[5]) Ernst Neubauer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 174, 1909.

[6]) In noch nicht abgeschlossenen Versuchen haben wir auch bei nebennierenlosen Hunden durch Lävulosezufuhr eine längere Persistenz des Leberglykogens erreichen können als durch Dextrosezufuhr.

Über die Entgiftung von Kaliumsalzen durch die Salze von Calcium und anderen Erdalkalimetallen.

Von

Jacques Loeb

(unter Mitwirkung von **Hardolph Wasteneys**).

(Aus dem Rockefeller Institute, New York.)

(Eingegangen am 19. März 1911.)

I.

Die Tatsache, daß Kalium durch Calcium entgiftet werden kann, ist seit Ringers[1]) Arbeiten jedem Biologen geläufig. Ringer zeigte anfangs der 80er Jahre, daß das Froschherz normalere Contractionen ausführt, wenn man der physiologischen Kochsalzlösung etwas Kaliumchlorid und etwas Calciumchlorid zufügt, als wenn man bloß eins der beiden Salze zur Kochsalzlösung zusetzt. Er zeigte ferner, daß, wenn man etwas zu viel Kalium zusetzt, eine Steigerung des Calciumzusatzes die giftige Wirkung des Kaliums wieder aufhebt.

Über den Mechanismus der antagonistischen Wirkung konnten die Versuche, die Ringer anstellte, nichts aussagen, erstens weil ihm quantitative Versuche und der Begriff des Entgiftungskoeffizienten fern lagen; und zweitens weil in seinen Versuchen außer KCl und $CaCl_2$ immer NaCl in der Konzentration zugegen war, die nach unserer früheren Mitteilung allein schon entgiftend auf KCl wirkt. Das gleiche gilt auch für die meisten Versuche, die seitdem über den Antagonismus von KCl und $CaCl_2$ angestellt worden sind. Eine Ausnahme bilden die Versuche, die ich an den frisch befruchteten Eiern von Fundulus

[1]) S. Ringer, Journ. of Physiol. 3, 380; 4, 29 u. 222; 5, 247.

anstellte.[1]) Für diese Eier ist aber, ehe der Kreislauf im Gange ist, Kalium nicht giftiger als Natrium, und daher werfen diese Versuche kein Licht auf die Gesetze der Entgiftung des Kaliums bei höheren Tieren, für die die Ionen dieses Metalls ein spezifisches Gift sind. Aus demselben Grunde lassen sich auch die wichtigen Versuche von Osterhout an Pflanzen für unsere Zwecke nicht verwerten.

Im Seewasser kommen auf 2,2 Moleküle KCl etwa 1,5 Moleküle $CaCl_2$; wenigstens haben meine Versuche über die Herstellung von künstlichem Seewasser ergeben, daß das Verhältnis von 100 Molekülen NaCl, 2,2 Molekülen KCl und 1,5 Molekülen $CaCl_2$ das Optimum darstellt.

Ich habe schon in der früheren Arbeit erwähnt, daß Fundulus in einer reinen Lösung von $CaCl_2$ von der Konzentration, in der dieses Salz im Seewasser vorhanden ist, nämlich 1,5 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ in 100 ccm der Lösung (in destilliertem Wasser), mehrere Wochen lebt. Auch etwas höhere Konzentrationen von $CaCl_2$, beispielsweise $^m/_{20}$ Lösungen, sind anscheinend ungiftig für Fundulus. Es handelt sich also bei der Entgiftung von KCl durch $CaCl_2$ um die Entgiftung durch ein (in den angewandten Konzentrationen) ungiftiges Salz. Das muß betont werden, weil $CaCl_2$ in der pharmakologischen Literatur meist als ein sehr giftiges Salz bezeichnet wird.

Wir wollen in der folgenden Abhandlung 3 Fragen beantworten. Erstens, was ist der Wert des Entgiftungskoeffizienten von Kaliumchlorid durch Calciumchlorid; zweitens, was ist der Entgiftungskoeffizient von KCl durch $MgCl_2$, $SrCl_2$ und $BaCl_2$; und drittens, was ist die maximale Konzentration von KCl, die durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann.

II. Der Entgiftungskoeffizient von KCl : $CaCl_2$.

Die Methode der Versuche ist dieselbe wie in den früheren Versuchen:[2]) je 6 (oder 7) Exemplare des marinen Fisches Fundulus wurden, nachdem sie zweimal in Süßwasser und einmal in destilliertem Wasser abgewaschen waren, in die Lösungen

[1]) Loeb, diese Zeitschr. 31, 450, 1911.
[2]) Am. Journ. Physiol. 6, 411, 1902.

(je 500 ccm) verteilt. Jeden Tag wurde die Zahl der überlebenden Fische in jeder Lösung festgestellt.

Die Natur der Lösung wird nach dem Gehalt an Salzen für je 100 ccm der Lösung angegeben. Die folgenden 4 Versuchsreihen mit 1,1, 1,65, 2,2 und 2,75 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung wurden gleichzeitig, also bei denselben Temperaturen, angestellt. Als Substrat diente nicht destilliertes Wasser, sondern $^m/_{100}$ NaCl-Lösung. Infolge der sensibilisierenden Wirkung dieser kleinen Dosen von NaCl wurden schärfere Grenzkonzentrationen für die Entgiftung erhalten. Als entgiftende Substanz dienten kleine Mengen einer $^m/_{20}$ $CaCl_2$-Lösung. Wachsende Mengen dieser letzteren Lösung wurden zur giftigen Lösung von KCl zugesetzt.

Tabelle I.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{20}$ $CaCl_2$							
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
1	5	7	6	7	7	6	6	6
2	2	4	5	7	6	6	6	6
3	1	1	4	7	6	6	6	6
4	0	0	4	7	6	6	6	6
5			4	7	6	6	5	6
6			4	7	6	6	5	6
7			4	7	6	6	5	6
10			4	7	6	6	5	6
14			4	7	6	6	5	6
16			4	6	2	5	5	6

Tabelle II.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{20}$ $CaCl_2$							
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
1	5	6	6	6	5	6	6	6
2	3	4	5	6	5	6	6	6
3	0	0	3	4	4	6	6	5
4			3	4	4	4	5	5
5			3	4	4	4	5	5
6			3	4	4	4	5	5
7			3	4	4	4	5	5
10			3	4	4	4	5	5
14			3	4	4	4	5	4
16			3	4	4	4	5	0

Tabelle III.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{20}$ $CaCl_2$							
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
1	7	7	7	6	6	6	6	6
2	3	3	3	5	4	4	5	6
3	0	0	0	2	0	3	3	6
4				1		3	3	6
5				1		3	3	6
6				1		3	3	6
7				1		3	3	6
10				1		3	3	6
14				1		3	3	6
16				0		3	3	6

Tabelle IV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,75 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{20}$ $CaCl_2$							
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
1	5	3	4	5	6	6	6	6
2	1	2	2	3	1	4	5	6
3	0	0	0	0	0	1	3	6
4						1	3	6
5						1	3	6
6						1	3	6
7						1	3	6
10						1	3	6
14						1	3	6
16						1	3	5

Stellen wir die Resultate dieser Versuche zusammen, so erhalten wir folgende Resultate:

Tabelle V.

	Entgiftungskoeffizient $\frac{KCl}{CaCl_2}$
1,1 ccm $^m/_2$ KCl wurden entgiftet durch 0,2 ccm $^m/_{20}$ $CaCl_2$;	55
1,65 „ „ „ „ „ „ 0,2 „ „ „	82,5
2,2 „ „ „ „ „ „ 0,4 „ „ „	55
2,75 „ „ „ „ „ „ 1,6 „ „ „	17

In diesen Versuchen war, wie gesagt, das Kalium- und Calciumchlorid nicht in destilliertem Wasser, sondern in $^m/_{100}$ NaCl gelöst, um die Bestimmung der Grenzkonzentration für die Entgiftung schärfer zu machen. Wir wollen nun die Ent-

giftungskoeffizienten nach einer Versuchsreihe wiedergeben, in der die Versuche mit Lösungen von KCl und $CaCl_2$ in destilliertem Wasser (statt in schwacher NaCl-Lösung) angestellt waren. Die zugefügten Mengen von $CaCl_2$ waren wachsende Quantitäten von $^m/_{40}$, nämlich 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,8 $^m/_{40}$ $CaCl_2$ zu je 100 ccm der KCl-Lösung.

Tabelle VI.

	Entgiftungskoeffizient
3,3 $^m/_2$ KCl in 100 ccm H_2O wurden entgiftet durch 1,6 ccm $^m/_{40}$ $CaCl_2$;	41
2,75 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 1,6 „ „ „	34
2,2 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,2 „ „ „	220
1,65 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,3 „ „ „	115
1,1 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,1 „ „ „	220

Wenn man diese weiten Unterschiede in der Größe der Entgiftungskoeffizienten bemerkt, so wird man die Frage aufwerfen, warum dieselben nicht so gut untereinander übereinstimmen, wie das bei den Koeffizienten $\frac{KCl}{NaCl}$ der Fall war. Die Antwort lautet, wie ich glaube, daß hier eine nicht kontrollierbare Variable mit im Spiele ist. Es scheint, daß es einen gewissen Prozentsatz von Fundulus — vielleicht gewisse Strains — gibt, die imstande sind, schon dann in einer KCl-Lösung zu leben, wenn derselben nur eine Spur $CaCl_2$ zugesetzt wird, während andere Individuen mehr $CaCl_2$ erfordern. Geraten nun ein oder mehrere solcher Individuen der ersten Art in die Lösung, so wird dadurch der Entgiftungskoeffizient außerordentlich erhöht. In Wirklichkeit kommt man vielleicht der Wahrheit am nächsten, wenn man sagt, daß es für die beiden „Rassen" von Fundulus je einen besonderen Entgiftungskoeffizienten für $\frac{KCl}{CaCl_2}$ gibt. Für die Majorität hat er einen Wert von 30 bis 50. Für die widerstandsfähige Rasse hat er einen Wert von etwa 100 bis 200 oder darüber.

Zur Illustration des Gesagten diene die folgende Tabelle VII.

Wenn man diese Tabelle genauer betrachtet, so kann man sich nicht gut dem Eindruck entziehen, daß man es hier mit 2 Arten von Tieren zu tun hat, von denen die eine einen erheblich niedrigeren Entgiftungskoeffizienten für Ca hat als die

andere, und daß es Sache des Zufalls ist, ob unter den 6 Fischen, die in eine Lösung kommen, alle oder die Mehrzahl der einen oder der anderen Rasse angehören. So ist unter den Fischen, die in der Lösung mit 0,3 ccm $CaCl_2$ waren, 1 Exemplar von besonderer Widerstandskraft, das lange überlebt, während in die Lösung mit 1,2 ccm $CaCl_2$ zufällig mehr Individuen mit geringerer Widerstandskraft gerieten.

Tabelle VII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung + 0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	2,0 ccm $^m/_{100}$ $CaCl_2$
1	4	4	6	6	5	5	5	4	5	6	6	6
2	0	1	6	5	5	5	3	3	3	6	5	5
3		0	4	3	4	3	3	2	3	2	4	4
4			1	2	4	1	3	2	3	2	4	4
5			1	1	3	0	1	1	3	1	4	4
6			1	1	3		1	1	3	1	4	4
7			1	1	2		1	1	3	1	4	4
8			0	1	2		1	1	3	1	4	4
12				1	0		0	1	3	1	4	4
16				1				1	3	1	3	3
20				1				1	2	1	3	3
22				1				1	2	1	3	2

Zu der Vermutung, daß es unter Fundulus je nach der Widerstandskraft (oder Permeabilität) verschiedene Strains oder Rassen gibt, war ich schon früher geführt worden im Anschluß an Versuche über die Wirkung von destilliertem Wasser. In einer späteren Arbeit komme ich hierauf zurück.

In einer 3. resp. 4. Versuchsreihe wurden wachsende Mengen von $^m/_{100}$ $CaCl_2$, nämlich 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6, 4,0 $^m/_{100}$ $CaCl_2$, zu je 100 ccm der Lösung zugesetzt. Die Tabelle VIII gibt die Entgiftungskonzentrationen und die Entgiftungskoeffizienten.

Tabelle VIII.

		Entgiftungskoeffizient
1,1 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm H_2O erfordern zur Entgiftg.	0,1 $^m/_{100}$ $CaCl_2$;	550
1,65 „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ „	0,5 „ „	165
2,2 „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ „	0,3 „ „	366
2,75 „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ „	1,0 „ „	137,5
3,3 „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ „	1,6 „ „	103
4,4 „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ „	8,0 „ „	27,5

Angesichts dieser Versuche dürfen wir sagen, daß der Entgiftungskoeffizient von $KCl : CaCl_2$ mindestens 30 ist, daß er aber den 10fachen Wert erreichen kann. Vielleicht ist er für höhere Konzentration von KCl geringer als für niedrige.

Der Entgiftungskoeffizient von KCl:NaCl war etwa $^1/_{17}$. Der Entgiftungskoeffizient $KCl : CaCl_2$ ist also mindestens 500 mal so groß wie der Entgiftungskoeffizient KCl:NaCl. Was bedingt diesen Unterschied? Es ist bekannt, daß die Salze der zweiwertigen Metalle im allgemeinen weniger löslich sind, als die Salze einwertiger Metalle. Nehmen wir nun an, daß es sich bei der Entgiftung durch NaCl um die Bildung eines löslichen, bei der Entgiftung durch $CaCl_2$ aber um die Bildung eines unlöslichen oder schwer löslichen Salzes handelt, so ist der Unterschied in der Größenordnung der beiden Entgiftungskoeffizienten zu verstehen. In früheren Versuchen hatten Gies und ich gefunden, daß 1 Molekül $ZnSO_4$ ausreicht, um 1000 Moleküle NaCl zu entgiften, während 50 Moleküle NaCl nötig waren, um 1 Molekül $ZnSO_4$ zu entgiften; alles das für gewisse Konzentrationen dieser Stoffe. Ich hatte nun schon früher die Annahme gemacht, daß die antagonistische Wirkung der zweiwertigen Metalle auf der Bildung einer unlöslichen Verbindung zwischen dem Metall und einem Bestandteil der Zelle oder ihrer Oberfläche beruht. Robertson hat darauf hingewiesen, daß dieser Umstand erklären könnte, daß die entgiftende Wirkung eines zweiwertigen Metalles so viel höher ist als die eines einwertigen. (Robertson, Ergebnisse der Physiologie 10, 1910).

III.

Um die eben erwähnte Ansicht zu prüfen, wurden Versuche über die relative entgiftende Wirkung von $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ und $BaCl_2$ angestellt. Diesen Versuchen lag die Erfahrung zugrunde, daß die Mg-Salze oft viel löslicher sind als die entsprechenden Salze der anderen 3 Metalle dieser Gruppe. Es stellte sich nun bei diesen Versuchen ausnahmslos heraus, daß es nicht oder nur für kurze Zeit gelingt, mit $MgCl_2$ eine Entgiftung von $CaCl_2$ herbeizuführen, während das mit $CaCl_2$, $SrCl_2$ und selbst, obwohl in geringerem Grade, mit dem so giftigen $BaCl_2$ für längere Zeit gelingt.

Die Versuche der Tabellen IX, X, XI und XII wurden gleichzeitig angestellt.

Tabelle IX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{100}$ $MgCl_2$									
	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	24,0	48,0
2	3	5	3	2	5	5	5	4	5	6
3	2	4	1	0	4	4	4	4	5	6
4	1	1	0		4	4	3	2	5	5
5	0	1			1	2	1	1	5	4
6		1			0	0	0	1	3	3
7		1						0	2	3
8		0							2	3
10									2	3
12									0	0

Tabelle X.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{100}$ $CaCl_2$								
	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	24,0	48,0
2	4	4	3	5	6	5	6	5	6
3	3	1	3	4	6	5	5	5	6
4	2	1	3	4	5	5	5	5	6
5	2	1	3	3	5	5	5	5	6
6	1	1	2	3	5	5	5	5	6
7	0	1	2	3	5	5	5	5	6
8		1	2	3	5	5	5	5	6
10		1	2	2	5	5	5	5	6
12		0	2	2	5	5	5	5	6
15			1	2	5	5	5	5	6
17			1	2	4	3	5	5	6

Tabelle XI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{100}$ $SrCl_2$								
	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	24,0	48,0
2	4	4	2	5	4	6	5	6	5
3	3	3	1	5	3	5	5	6	5
4	3	2	0	4	2	5	5	6	5
5	2	2		3	2	5	5	6	5
6	2	2		2	2	4	5	6	5
7	0	2		2	1	4	5	6	5
8		0		1	1	4	5	6	5
10				1	1	4	5	6	5
12				1	1	4	5	5	5
15				1	1	3	5	3	4
17				1	1	0	5	0	2

Tabelle XII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_{100}$ $BaCl_2$								
	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	24,0	48,0
2	4	4	5	5	5	6	5	2	4
3	2	2	4	4	4	5	4	2	2
4	2	1	3	4	3	5	4	1	2
5	1	1	2	3	3	5	4	1	2
6	1	1	0	2	2	5	4	1	2
7	0	0		1	1	4	4	1	1
8				0	1	4	2	1	1
10					1	2	1	1	1
12					0	0	0	1	1
15								1	1
17								0	0

Das Resultat ist ganz typisch. Während in 11 Tagen alle Tiere in der Mg-Reihe tot waren, waren die in der Calciumreihe und selbst in der Strontiumreihe noch nach 17 Tagen der Mehrzahl nach am Leben. Es könnte nun der Gedanke entstehen, daß eine höhere Konzentration von $MgCl_2$ zur Entgiftung von KCl nötig ist. Dieser Gedanke erhält dadurch a priori eine Stütze, daß Mg in höherer Konzentration als Ca im Seewasser enthalten ist, nämlich 7,8 Moleküle $MgCl_2$ + 3,8 Moleküle $MgSO_4$ auf je 1,5 Moleküle $CaCl_2$. Es stellt sich aber heraus, daß Mg auch in der stärksten Konzentration nur eine geringe entgiftende Wirkung auf KCl hat. Als Beispiel diene Tabelle XIII.

Tabelle XIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung + ccm $^m/_2$ $MgCl_2$										
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
2	4	3	4	5	5	6	6	6	6	4	4
3	2	3	4	5	5	6	6	6	5	2	4
4	1	3	4	5	5	6	6	6	5	2	3
5	0	3	4	5	4	6	4	5	3	2	2
7		2	2	1	2	2	2	0	0	0	1
8		0	1	1	1	0	2				0
10			0	0	0		0				

Man sieht, daß es auch bei den stärksten Gaben von $MgCl_2$ nicht gelingt, eine Entgiftung von der Dauer und Vollständigkeit herbeizuführen, wie diese durch $CaCl_2$ und $MgCl_2$ möglich ist.

Man könnte nun den Einwand erheben, daß vielleicht das $MgCl_2$ in den hier benutzten Konzentrationen giftig sei. Die folgende Tabelle XIV zeigt aber, daß das nicht der Fall ist. Es handelt sich um eine Versuchsreihe mit reinen $MgCl_2$-Lösungen von denselben Konzentrationen von $MgCl_2$, die in dem vorausgehenden Entgiftungsversuch zur Anwendung kamen.

Tabelle XIV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in ccm $^m/_2$ $MgCl_2$ in 100 ccm der Lösung				
	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
2	5	6	6	6	5
3	5	5	6	6	4
4	5	5	6	5	4
5	5	5	6	5	4
7	4	4	6	5	3
8	4	4	5	5	3
10	4	3	4	5	3
14	4	2	2	5	3

Die Versuche in Tabelle XIII und XIV waren gleichzeitig, also bei derselben Temperatur, angestellt worden. Da in der reinen $MgCl_2$-Lösung (Tab. XIV) die Fische der Mehrzahl nach am Leben blieben, so muß das entgegengesetzte Verhalten in Tabelle XIII daran liegen, daß das $MgCl_2$ die Giftwirkung von 2,2 ccm $^m/_2$ KCl nicht zu hemmen vermochte.

In bezug auf $BaCl_2$ liegen die Dinge aber anders; $BaCl_2$ ist nämlich in den Konzentrationen, in denen es hier zur Anwendung gelangt, ein starkes Gift für die Fische. Wir können also hier sagen, daß trotz dieser Giftwirkung $BaCl_2$ imstande ist, die Kaliumchloridlösung wenigstens so weit zu entgiften, daß einige Fische länger am Leben bleiben können, als bei dem Zusatz des an sich ungiftigen $MgCl_2$. $BaCl_2$ hat also eine viel stärkere entgiftende Wirkung auf KCl als $MgCl_2$.

Wenn nun die Ansicht richtig ist, daß $CaCl_2$ eine unlösliche Verbindung mit einem Stoffe an der Oberfläche des Fisches eingeht, so muß es sich um einen Stoff handeln, der mit Mg eine leicht lösliche, mit Sr dagegen und vermutlich auch Ba ebenfalls eine schwer lösliche Verbindung bildet.

IV. Die maximale Konzentration von KCl, die durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann.

Was ist die maximale Konzentration von KCl, die durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann? In der Abhandlung über die Entgiftung von KCl durch $CaCl_2$ erwähnte ich, daß 6,6 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung ungefähr die höchste Konzentration von KCl ist, die durch NaCl entgiftet werden kann. Es war von Interesse, festzustellen, ob dieselbe obere Grenze auch für die Entgiftung von KCl durch $CaCl_2$ existiert. Es sei von vornherein bemerkt, daß die Versuche diese Frage bejaht haben. Zum Belege sei eine Versuchsreihe mitgeteilt mit 2,2, 3,3, 4,4, 5,5 6,6, 7,7, 8,8, 9,9 und 11,0 KCl in 100 ccm der Lösung. Außerdem enthielt jede Lösung 1,5 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ per 100 ccm der Lösung. Man sieht, daß in den Lösungen bis zu 5,5 ccm ein Teil oder die meisten Fische am Leben bleiben, während sie in den Lösungen mit 6,6 ccm oder mehr $^m/_2$ KCl (in 100 ccm der Lösung) rasch sterben.

Tabelle XV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,5 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ + ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung								
	2,2	3,3	4,4	5,5	6,6	7,7	8,8	9,9	11,0
3	7	5	4	4	1	2	2	0	0
4	7	5	2	3	0	1	1		
5	7	5	2	3		0	0		
7	7	5	2	3					
9	7	5	2	3					
12	7	5	2	3					
15	7	5	2	3					
17	7	5	2	3					
20	0	5	2	3					

Dieser Versuch gab als Maximum von KCl, das durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann, 5,5 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung. Es war in diesem Versuch überall nur die gleiche Menge von $CaCl_2$, nämlich 1,5 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ pro 100 ccm der Lösung zugesetzt worden. Da der Entgiftungskoeffizient für KCl durch $CaCl_2$ sehr groß ist, nämlich über 30, so ist 1,5 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ theoretisch ausreichend zur Entgiftung, nicht nur von 6,6, sondern von 45 ccm $^m/_2$ KCl. Da aber in solchen Dingen nichts dem Zufall überlassen bleiben darf, so wurden Versuche mit mehr $CaCl_2$ als 1,5 ccm $^m/_2$ pro 100 ccm der Lösung angestellt.

Es wurden 5 Versuchsreihen mit denselben Konzentrationen von KCl wie im letzten Versuch durchgeführt, aber mit verschiedenen Mengen von $CaCl_2$, nämlich 8, 6, 4, 2 und 1 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ pro 100 ccm der Lösung. Es gelang in keinem Falle, die Fische in Lösungen mit mehr als 6,6 ccm $^m/_2$ KCl mehr als 3 Tage am Leben zu erhalten; wie zu erwarten, war 1 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ ausreichend zur Entgiftung von 5,5 resp. 6,6 ccm $^m/_2$ KCl. Wir kommen also zu dem Schlusse, daß 6,6 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung die maximale Konzentration von KCl ist, die durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann.

Im Anschluß an diese Versuche entstand die weitere Frage, ob vielleicht $CaCl_2$ und NaCl zusammen eine höhere Konzentration von KCl zu entgiften imstande sind, als eines der beiden Salze allein. Es wurden deshalb zu je 100 ccm $^m/_2$ NaCl + 1,5 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ der Reihe nach 2,2, 3,3, 4,4, 5,5, 6,6, 7,7, 8,8, 9,9 und 11,0 $^m/_2$ KCl zugefügt und wie immer 6 Fundulus in je 500 ccm dieser Mischung gebracht. Tabelle XVI gibt das Resultat eines solchen Versuches.

Tabelle XVI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 100 ccm $^m/_2$ NaCl + 1,5 ccm $^m/_2$ $CaCl_2$ + ccm $^m/_2$ KCl								
	2,2	3,3	4,4	5,5	6,6	7,7	8,8	9,9	11,0
3	7	6	4	5	6	5	0	0	0
4	7	6	4	5	6	5			
5	7	6	4	5	6	0			
7	7	6	4	5	6				
9	6	6	4	5	5				
12	6	6	4	5	5				
15	6	6	4	5	4				
17	6	6	4	5	2				
20	6	6	4	5	0				

Vergleicht man Tabelle XV mit Tabelle XVI, so sieht man, daß auch die Kombination von NaCl und $CaCl_2$ nicht mehr als 6,6 ccm $^m/_2$ KCl entgiften kann. Allerdings wurden durch $CaCl_2$ allein in Tabelle XV bloß 5,5 ccm $^m/_2$ KCl entgiftet, aber das dürfte wohl ein Zufall sein, da in derselben Versuchsreihe mit $^m/_2$ NaCl allein (die hier nicht mitgeteilt werden soll) 6,6 ccm $^m/_2$ KCl entgiftet wurden. Der wesentliche Unterschied von NaCl + $CaCl_2$ gegenüber $CaCl_2$ allein scheint wohl darin zu liegen, daß im ersteren Falle mehr

Fische in jeder Lösung (mit weniger als 6,6 ccm $^m/_2$ KCl) am Leben blieben als mit $CaCl_2$ allein; mit anderen Worten: das Zusammenwirken von NaCl + $CaCl_2$ scheint die Undurchgängigkeit des Tieres für KCl vollständiger zu machen, als das durch $CaCl_2$ allein möglich ist.

V. Theoretische Bemerkungen.

Als wesentliches Resultat dürfen wir die Tatsache hinstellen, daß der Entgiftungskoeffizient von KCl durch $CaCl_2$ gewöhnlich größer ist als 30, daß er also mindestens 500 mal so groß ist wie der Entgiftungskoeffizient von KCl durch NaCl. Ferner ist es auffallend, daß die Grenzkonzentration für die Entgiftung von KCl durch $CaCl_2$ keine so scharfe ist wie bei der Entgiftung von KCl durch NaCl; was zum Teil daran liegen dürfte, daß zu kleine Dosen von $CaCl_2$ nicht sensibilisierend wirken, wie das für die Entgiftung von KCl durch NaCl der Fall war. Es dürfte aber noch ein anderer Umstand hier im Spiele sein, nämlich, daß die Entgiftungskonzentration von KCl durch $CaCl_2$ nicht bei allen Individuen oder Rassen von Fundulus genau die gleiche ist. Sind wenige Individuen in eine Lösung gebracht, so ist es unvermeidlich, daß die verschiedenen Lösungen nicht immer ganz gleichartige Tiere enthalten.

Wie kommt nun die Entgiftung von K durch Ca in diesen Versuchen zustande? Zunächst dürfen wir auch hier davon ausgehen, daß das Ca die KCl-Lösung dadurch entgiftet, daß es das letztere daran hindert, in giftigen Dosen in den Fisch zu diffundieren. Aber wie hindert es diese Diffusion? Bei der Besprechung der Entgiftung von KCl durch NaCl wurden wir zu der Annahme geführt, daß K und Na sich um dasselbe Anion an der Oberfläche (den Kiemen des Fisches) bewerben, und sobald mehr als $^1/_{17}$ dieser Anionen sich mit K verbinden, zu viel Kalium in das Tier gelangt; sei es, daß die Membran durchgängiger wird, oder sei es, daß K nur in der Form dieser organischen Verbindung (Fettsäure oder Eiweiß?) in das Tier diffundieren kann.

Nach dieser Annahme sollte man erwarten, daß der Entgiftungskoeffizient KCl : $CaCl_2$ (mit Rücksicht auf die Zweiwertigkeit von Ca) etwa $^1/_8$ betragen würde. Er beträgt aber 30 und oft viel mehr. Die hier bestehende Schwierigkeit wird

beseitigt, wenn wir annehmen, daß Ca mit dem organischen Anion an der Oberfläche des Tieres eine unlösliche Verbindung bildet, während K und Na lösliche Verbindungen mit der betreffenden Substanz bilden. In dem Fall muß natürlich schon eine sehr niedrige Konzentration von $CaCl_2$ ausreichen, um so viel K aus der Verbindung mit dem organischen Anion an der Oberfläche des Tieres zu verdrängen, daß die in der vorauf-gehenden Arbeit gemachte Bedingung erfüllt ist.

Diese Ansicht erhält anscheinend eine Stütze in der Beobachtung, daß es gelingt, auch mit Sr und Ba relativ lange eine Entgiftung von KCl herbeizuführen; daß die entgiftende Wirkung von $MgCl_2$ aber sehr gering ist und, was an solcher Wirkung auftritt, nur ein paar Tage dauert. Da im allgemeinen die Magnesiumsalze viel löslicher sind als die Calciumsalze, so spricht dieser Befund allerdings im Sinne unserer Annahme.

Sehr wichtig erscheint mir die Tatsache, daß die maximale Konzentration des KCl, die durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann, identisch ist mit der maximalen Konzentration von KCl, die durch NaCl entgiftet werden kann, nämlich 6,6 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung (das Dreifache der Konzentration, in der KCl im Seewasser enthalten ist). Diese Tatsache erhält vielleicht ihre Aufklärung dadurch, daß die Kombination von $NaCl + CaCl_2$ dieses Maximum nicht erhöht, sondern nur den Schutz gegen KCl vollkommener macht, d. h. einer größeren Zahl von Tieren erlaubt, zu überleben. Diese Tatsachen weisen darauf hin, daß in letzter Instanz die Schutzwirkung sowohl von NaCl als auch von $CaCl_2$ gegen KCl darauf beruht, daß sie der Oberflächenlamelle des Tieres durch eine Art von Gerbung einen höheren Grad der Undurchgängigkeit gegen KCl verleihen. Wir werden Gelegenheit haben, auf diese Möglichkeit in einer der folgenden Arbeiten zurückzukommen.[1])

VI. Zusammenfassung der Resultate.

1. In einer früheren Arbeit war gezeigt worden, daß NaCl eine KCl-Lösung für Fundulus dann entgiftet, wenn mindestens

[1]) Daß Ca und nicht Cl die Entgiftung von K bewirkt, wird hier als selbstverständlich nach den Versuchen über die Entgiftung von K durch NaCl angenommen. Wenn das Cl-Ion in $CaCl_2$ das entgiftende Ion wird, so sollte der Entgiftungskoeffizient von KCl : NaCl = 15 sein, während er in Wirklichkeit $^1/_{17}$ ist. $CaBr_2$ wirkt ebenso stark entgiftend auf KCl wie $CaCl_2$.

15 bis 17 Moleküle NaCl auf 1 Molekül KCl in der Lösung enthalten sind. In der neuen Arbeit wird gezeigt, daß eine KCl-Lösung durch $CaCl_2$ schon dann entgiftet wird, wenn $^1/_{30}$ Molekül $CaCl_2$ auf 1 Molekül KCl in der Lösung enthalten ist. Oft tritt schon teilweise Entgiftung ein, wenn nur $^1/_{300}$ Molekül $CaCl_2$ auf 1 Molekül KCl in der Lösung vorhanden ist.

2. Während die Grenzkonzentration, in der NaCl eine gegebene Konzentration von KCl entgiftet, sehr scharf ist, ist dieselbe für $CaCl_2$ nicht so scharf. Es wird ein Versuch gemacht, diesen Unterschied zu erklären.

3. Es wird gezeigt, daß $MgCl_2$ das KCl nur in geringem Grade und nur für kurze Zeit entgiften kann, während $SrCl_2$ einen fast ebenso hohen Entgiftungskoeffizienten hat wie $CaCl_2$. Auch $BaCl_2$ hat einen hohen Entgiftungskoeffizienten; allein dieses letztere Ion ist selbst so giftig, daß dieser Umstand teilweise die entgiftende Wirkung desselben auf KCl verdeckt.

4. Es wird darauf hingewiesen, daß Ca vielleicht deshalb in so geringer Konzentration das KCl entgiftet, weil es mit demselben Anion an der Oberfläche (den Kiemen?) des Fisches, mit dem K und Na eine lösliche Verbindung bilden, eine unlösliche Verbindung bildet. Das würde bedingen, daß bereits eine kleine Menge $CaCl_2$ imstande sein müßte, das K aus diesen Verbindungen zu verdrängen, während eine relativ große Menge Na hierfür erforderlich ist. Was für Ca gilt, gilt auch für Sr und Ba.

5. Es wird gezeigt, daß die höchste Konzentration von KCl, die durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann, identisch ist mit der höchsten Konzentration von KCl, die noch durch NaCl entgiftet werden kann, nämlich 6,6 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung. Diese Zahl bleibt auch das Maximum, wenn man beide Stoffe, $CaCl_2$ und NaCl, gleichzeitig zur Entgiftung zufügt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Herrn Direktor Townsend und Assistent-Direktor Osbourne vom New-Yorker Aquarium, denen ich das Material für diese Versuche verdanke, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Über zuckerfreie Hefegärungen. II.

Von

C. Neuberg und L. Tir.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiolog. Instituts der Kgl. Landw. Hochschule zu Berlin.)

Einer Reihe einfacher Körper kommt, wie vor einiger Zeit Neuberg und Hildesheimer[1]) mitgeteilt haben, die Fähigkeit zu, mit Hefe in eine Art „Gärung“[2]) zu geraten. Die prinzipielle Bedeutung dieser Feststellung ist darin gelegen, daß es sich um Substanzen handelt, die nicht zu den Kohlenhydraten gehören und trotz Abwesenheit von Zuckerarten doch von Hefe „vergoren“ werden.

Um zu einer Erklärung dieser eigentümlichen Erscheinung zu gelangen, schien es wünschenswert, zunächst einmal das Verhalten einer größeren Anzahl einfacher Verbindungen beim Zusammenbringen mit verschiedenen Heferassen und Hefepräparaten zu prüfen.

Um die mehr als 500 Einzelversuche, über die wir verfügen, nicht gesondert aufführen zu müssen, verweisen wir auf beifolgende Übersichtstabelle, in die nur die in jeder Beziehung einwandsfrei verlaufenen Versuche Aufnahme gefunden haben.

---

[1]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, diese Zeitschr. **31**, 170, 1911; vgl. auch Verhdl. d. Berl. physiol. Ges. vom 20. Jan. 1911.

[2]) Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei betont, daß die Bezeichnung „Gärung“ nichts bezügl. eines Zusammenhanges mit der alkohol. Gärung präjudizieren soll; die Benennung ist gewählt, so wie man von Essig- und Citronensäuregärung oder von einer Gärung der Aminosäuren spricht.

Stunden	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36
Hefe-Rassen	Ameisens. K 1 %		Essigs. Na 1 %		Propions. K 3 %		Butters. K 3 %		Äthylenglykol 3 %		Propylenglykol 3 %		Glycerin 3 %		Glycols. K 1 %		Glyoxyls. K 1 %	
A.	1	1,5	1	1,5	1	2	+ 1,5	2	+ 1,5	2,5	+ 1	1,5	+ 2	3	2	3	3	4
B.	1,5	2	Sp.	0,5	0	0		0		1		2		3	1	1¼		0
D.	Sp.	Sp.	0	Sp.	0	0	+	0	+ 0,5	1	+	Sp.	+ 1	4,5	2	2	1	1,5
M.	0	0	Sp.	0,5	0	0		4		1		0		2		0	0	Sp.
II.	0	0	Sp.	0,5	0	0	+	0	+ Sp.	0,5	+	Sp.	+ Sp.	3,5		Sp.		0,5
XII.	0,5	0,5	0,5	1	0	0		0				0		Sp.	1,5	2		Sp.
																		Hefanol mit
	3	4,5	1,5	5,5					3	5,5				Sp.	0,5	2		0
																		Hefanol mit
															0,5	0,5		0
																		Zymin mit
					0,5								0,5					

Die mit „+" bezeichneten Angaben sind mit einer 1 %igen Lösung ausgeführt, Sp. bedeutet Spur.

24	36	Milchs. K 3 %	24	36	Brenztraubens. K 3 %	24	36	β-Oxybutters. Na 1 %	24	36	Apfels. K 3 %	24	36	Glycerins. K 1 %	24	36	Glycerins. K 5 %	24	36	Milchs. K. 5 %	24	36	Milchs. Na 2 %	24	36	d-Glucons. Ca 1 %	24	36	Brenzweins. K 1 %
									+	1	1,5	3		6				2,5		3	0,5		1,5	2		5,5	3,5		4,5
1,5			8		10	0,5		1			5	Sp.		3,5	3			1		1			0,5	2		2	Sp.		0,75
			9		11				+		0	3		3				1		1			0,5	0,5		4	1		1
3,5			5		11	0		0,5			5,5	0		1	1			0,5		0,5	0		0	3		4			Sp.
			9		11				+	0,5	5,5	3		5				2,5		3,5	2,0			4		4	Sp.		0,5
2,5			8		11	Sp.		0,5			4				1						0,5			2,5		5	1		1,5
1 %iger Lösung.																													
				6,0		1		3			0										2			1,5		7	0,5		2,5
2 %iger Lösung.																													
0										1					0									1		1			Sp.
2 %iger Lösung.																													
				10,0						6,0			5,5						4,0									

Stunden	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36	24	36
Hefe-Rassen	Oxals. K 1%		Maleins. K 1%		Fumars. K 1%		Bernsteins. K 3%		d-Weins. K (neutr.) 3%		d-Zuckers. K 1%		Trioarballyls. K 1%		Aconits. K 1%		norm. Citronens. K 3%	
A.	2,5	3,5	1,5	2	2,0	3	+ 0,5	1	+ 1	2	5	5	0,5	1	3,5	4	+ 0,5	1,5
B.	Sp.	0,5			2,5	4		3		8,0	1	1	1,5	3	0,75	2		4
D.	1	2	0,5	0,5	2	2	+ 0	0,5	+ 0	0,5	1,5	1,5	Sp.	1	Sp.	0,5	+ 0	1
M.		0	0	0,5	Sp.	1,0		3		3	0	0		0,5	Sp.	3		2
II.	0	0,5	0,5	1	0,5	2,5	+ Sp.	1	+ 0	0	0,5	1	Sp.	1	Sp.	1,5	+ 0	0,5
XII.	0,5	0,5	0	1	1	5,5		3		1	0,5	7,5	2	2,5	0,5	1,5		4,0
																	Hefanol mit	
	Sp.		3,5		1		2				1		1,5		2,5		4	
																	Hefanol mit	
									5	8	0							
																	Zymin mit	
									4,0									

Die mit „+" bezeichneten Angaben sind mit einer 1%igen Lösung ausgeführt.
Sp. bedeutet Spur.

24 36	24 36	24 36	24 36	24 36	24 36	24 36	24 36	24 36	24 36
Citronens. Na (3 bas.) 3 %	Citronens. Na (sauer) 3 %	Citrasons. K 1 %	Asparagins. Na 3 %	Glycerinphosphors. Ca 3 %	Alanin 3 %	Seidenfibroinpepton 3 %	Lecithin 3,5 u. 1 %	Phlorizin 1 %	Hefe für sich
+ 2,5 4	+ 1 1,5	2 2,5	1 2,5	1,5 2,5	1,5 2	1,5 2,5	+ 0,5 0,5	Sp. 2	0 1,5
3	1	0,75 2	3,5	0,5 2	Sp. 2	Sp. 4	5	0 1	Sp.
+ 0,5 1,5	+ Sp.	1 1,5	Sp. 1	Sp. 1,5	Sp.	Sp.	+ Sp. 1	Sp. 0,5	0 Sp.
3	2	0 0,5	1,5	Sp. 1,5	Sp.	Sp. 1,5	3	Sp.	Sp.
+ 1 2,5	+ Sp. 1,5	Sp.	0 1	0,5 3	Sp.	1,5 2,5	+ 0 0,5	Sp.	0 1
4,0	10,0	Sp. 1	1	8 10	Sp.	Sp. 2	1	0,5	Sp.
1 % iger Lösung.									
3,5	2,5	0	6 7,5	4 9			6	1,5 2,5	1
2 % iger Lösung.									
	0 Sp.								
2 % iger Lösung.									
	3,0			6,0	3,0				0,5

Zu denselben ist folgendes zu bemerken:

a) Benutzt wurden 6 Reinzuchthefen, die wir wiederum der Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. P. Lindner vom Institut für Gärungsgewerbe verdanken. Von diesen Hefen waren

Nr. A., B., M., II., XII. obergärig,
Nr. D. untergärig.

b) Weiter wurden Aceton-Dauerhefenpräparate verwendet, und zwar Zymin und Hefanol.

c) Die Lösungen der geprüften Substanzen waren 1-, 2-, 3- und 5%ig. (Die Konzentration ist in der Tabelle verzeichnet.) Neutrale Körper wurden als solche, Säuren als Salze benutzt und zwar in Form der Kalium-, Natrium- und Kalksalze. Bei mehrbasischen Säuren wurden neutrale wie saure Salze verwendet, wie aus der Tabelle ersichtlich ist.

d) Alle Versuche wurden in Schrötterschen Gärröhrchen bei 30 bis 34° vorgenommen. Es wurden stets 15 ccm der entsprechenden Lösung mit 1 g der Reinzuchthefe in Reagensgläsern durchgeschüttelt. Von der Mischung wurde in die 10 bis 11 ccm fassenden Gärröhrchen eingefüllt und ein Quecksilberverschluß vorgenommen.

e) Bei den Versuchen mit Zymin und Hefanol wurde gleichfalls 1 g des Hefepräparates auf 15 ccm der Lösung verwendet und 0,5 bis 1 ccm Toluol zugegeben. (Die Zyminversuche mußten bald abgebrochen werden, da ein neu bezogenes Präparat eine sehr erhebliche Selbstgärung zeigte.)

f) Die entwickelte Gasmenge wurde nach 24 und 36 Stunden abgelesen. Beide Werte sind in der Regel in der Tabelle verzeichnet; wo nur eine Angabe aufgeführt ist, bezieht sie sich auf 24stündige Versuchsdauer.

g) In der letzten Kolumne ist die durch Selbstgärung entwickelte Gasmenge (nach 24 und 36 Stunden) verzeichnet. Es ist dieses diejenige Menge Gas, die je 1 g der betr. Hefe oder des Hefepräparates, aufgeschwemmt in 15 ccm H_2O nach Einfüllung in dieselben Schrötterschen Gärröhrchen, unter genau den gleichen Bedingungen wie die eigentlichen Gärversuche liefert.

Es scheint uns zweckmäßig, vorläufig nur die starken Ausschläge zu berücksichtigen. Hierbei ergibt sich folgendes:

1. Für eine größere Reihe einfacher Substanzen sind eine oder mehrere Hefenrassen gefunden, die lebhafte „Gärung" veranlassen. Es sind dieses:

Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, Äthylenglykol, Glycerin, Glyoxylsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, l, β-Oxybuttersäure, Äpfelsäure, d, l-Glycerinsäure, d-Gluconsäure, Brenzweinsäure, Oxalsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Bernsteinsäure, d-Weinsäure, d-Zuckersäure, Tricarballylsäure, Aconitsäure, Citronensäure, Asparaginsäure, Glycerinphosphorsäure, d, l-Alanin, Seidenfibroinpepton, Lecithin.

Die Gasentwicklung erfolgt, wenn diese Substanzen in 1 bis 3%iger Lösung[1]) vorhanden sind. Die Säuren sind als Alkali- oder Erdalkalisalze verwendet, am geeignetsten scheinen die Kaliumsalze zu sein.

2. Der Prozeß ist vom Leben der Hefe trennbar. Das geht klar aus den Versuchen mit Zymin und Hefanol bei Toluolgegenwart hervor. Dadurch gewinnen die Erscheinungen besondere Bedeutung. Jeder Verdacht einer Bakterienmitwirkung ist dadurch beseitigt; eine solche war ja auch durch die Verwendung von Hefereinkulturen und bei der Kürze der jeweiligen Versuchsdauer wenig wahrscheinlich.

3. Das entwickelte Gas, dessen Natur in allen oben aufgeführten Fällen geprüft wurde, ist ausnahmslos[2]) Kohlendioxyd.

4. Dadurch wird es wahrscheinlich, daß die beobachteten Erscheinungen mit den Vorgängen der Atmung zusammenhängen, von denen die alkoholische Gärung vielleicht ein Sonderfall ist.

Bei der schweren Zugänglichkeit reinen Brenztraubenalkohols ist es uns bisher nicht möglich gewesen, den zweiten Teil der früher von Neuberg und Hildesheimer[3]) mit aller Reserve geäußerten Hypothese zu prüfen, nämlich die „Vergärbarkeit" eben des Brenztraubenalkohols. Weiter ist zu untersuchen, ob man Äthylalkohol neben CO_2 bei gemeinsamer Vergärung von Brenztraubensäure und Brenztraubenalkohol er-

[1]) Stärkere Konzentration ist meist ungünstig.

[2]) Das bei der „Gärung" des Na-Acetats gebildete Gas wurde nur teilweise von Kalilauge absorbiert.

[3]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, l. c.

hält, die, wie schon früher betont[1]), ja nichts anderes als die Umlagerungsprodukte des Methylglyoxals nach Canizzaro sind.

Dagegen wurde eine andere interessante Substanz auf ihr Verhalten zu lebender und abgetöteter Hefe untersucht, nämlich die Oxalessigsäure, $COOH.CO.CH_2.COOH$. Das Resultat war ein sehr merkwürdiges, indem hier eine Verbindung gefunden wurde, die ebenso schnell und leicht wie Zucker mit Hefe CO_2 entwickelt.

Nach Wohl und Österlin[2]) hat man zwischen verschiedenen sterischen Formen der Oxalessigsäure zu unterscheiden. Wir benutzten die bei 152° schmelzende Säure, die nach Wohl und Claußner[3]) die Oxymaleinsäure $\begin{matrix} C(OH)—COOH \\ \| \\ CH — COOH \end{matrix}$ ist.

Das Verhalten der Oxalessigsäure zu Hefe und Hefanol geht aus nachstehender kleiner Tabelle hervor, zu der folgendes zu bemerken ist:

1. Die Hefe war gärkräftige käufliche Preßhefe, die keine merkliche Selbstgärung zeigte.

2. Die Hefanolversuche wurden sämtlich unter Zusatz von Toluol angestellt.

3. Zur Verwendung kamen die freie Säure, ihr saures und neutrales Kaliumsalz. Alle Lösungen dieser Substanzen wurden bei der bekannten Empfindlichkeit der Oxalessigsäure in der Kälte hergestellt, die Alkalisalze durch vorsichtigen Zusatz der berechneten Menge kalter Kalilauge.

Die Menge der entwickelten Kohlensäure wurde nach 1, 6 und 20 Stunden gemessen; die angegebenen Zahlen bedeuten Kubikzentimeter CO_2 nach diesen Zeiten.

Oxalessigsäure.

	Freie Säure			Saures K-Salz			Neutrales K-Salz		
Hefe	1	8	10	1	6	7	Sp.	4	7
Hefanol	3	7	9	2	5	6,5	2	5	10
Substanz ohne Hefezusatz	0	0	Sp.	0	0	0	0	0	Sp.

[1]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, l. c.

[2]) A. Wohl und Österlin, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 1139, 1901 und A. Wohl, ebenda 40, 2282, 1907.

[3]) A. Wohl und P. Claußner, ebenda 40, 2309, 1907.

Wie ersichtlich, wird die Oxalessigsäure außerordentlich schnell und kräftig von der Hefe angegriffen. Daß es sich dabei nicht um eine Kohlensäureabspaltung etwa durch die angewandte Temperatur von 30 bis 32° C handelt[1]), lehren die Kontrollen mit der Säure bzw. ihren Salzen für sich ohne Zusatz von Hefe oder Hefanol.

Die Oxalessigsäure verdient deshalb Beachtung, weil sie zu wichtigen Substanzen in naher, experimentell festgelegter Beziehung steht. So ist sie einerseits ein Anhydrid der Weinsäure, andererseits das erste Oxydationsprodukt von Apfelsäure und Asparaginsäure. Durch die Fähigkeit zur Abspaltung von Kohlensäure und Kohlenoxyd hängt die Oxalessigsäure mit der 3-Kohlenstoffreihe, insbesondere mit der Brenztraubensäure und der Malonsäure, zusammen.

Betrachtet man die sub 1. aufgeführten Substanzen, so sieht man, daß sich als mit Hefe „gärbar" solche Verbindungen erwiesen haben, die entweder wie die Pflanzensäuren in den natürlichen Gärgütern (Trauben- und Fruchtsäften) ziemlich reichlich vorkommen, oder sonst zu den Leibessubstanzen oder Stoffwechselprodukten der Hefe in Beziehung stehen (wie Fettsäuren, Glycerin und Lecithin). Die schnelle Reaktion der Oxalessigsäure sowie die bei allen Hefen sich dokumentierende besondere Angreifbarkeit der Brenztraubensäure deuten vielleicht auf nähere Beziehungen dieser Substanzen zur Zymasegärung. Insbesondere scheint in dieser Hinsicht die Oxalessigsäure wegen ihres ausgesprochen labilen Charakters Prüfungen in mannigfacher Richtung wert.

Bei der Ausführung der Versuche haben wir uns der Hilfe von Frl. Gulbransen zu erfreuen gehabt und danken ihr vielmals.

[1]) Bei dieser Temperatur ist übrigens die Oxalessigsäure beständig.

Über die Dualität der Chlorophyllane.

Von

L. Marchlewski.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität zu Krakau.)

(Eingegangen am 27. März 1911.)

Die Streitaxt ruhen zu lassen fällt Hern Tswett schwer. Durch nicht genügend aufmerksame Lektüre meiner Publikationen wird er neuerdings[1]) zum unbegründeten Vorwürfemachen verleitet. Dies illustrieren folgende, meinen Abhandlungen entnommene Sätze: „Die Chlorophyllane zeigen bekanntlich in der Regel im roten Teil des Spektrums nur ein Band. . . . Manchmal zeigt das Chlorophyllan auch ein Doppelband im Rot, worauf zuerst Tswett aufmerksam machte."[2]) „Die hier beschriebenen Ergebnisse bilden eine teilweise Bestätigung der Resultate, die Tswett erhalten hat, nämlich daß Phylloxanthin ein Derivat des Allochlorophylls ist. Wenn wir nun auch keineswegs die Details der Tswettschen Untersuchung billigen können, besonders auch seine spektralanalytischen Angaben, so macht es dem einen von uns besondere Freude, endlich einmal mit Tswett übereinstimmen zu können."[3]) Die Resultate Tswetts wurden also durchaus nicht verschwiegen, im Gegenteil vollauf gewürdigt; die Phylloxanthinfrage ist ja diejenige, um die sich seit Stokes die Dualitätsfrage der Chlorophyllane und Chlorophylle dreht.

Den anderen von Tswett gemachten Prioritätsansprüchen kann ich jedoch aus rein sachlichen Gründen nicht beipflichten. Die Folgerung, daß Chlorophyllane unter Umständen uneinheitlich sein können, zogen wir aus dem Verhalten solcher Chlorophyllane zu $Zn(OH)_2 + CO_2$, die aus Rohchlorophyllösungen hergestellt wurden, die nach dem Sorbyschen, von Marchlewski und C. A. Schunck näher ausgearbeiteten Verfahren die Anwesenheit von Allochlorophyll aufwiesen. Fehlte das Allochloro-

---

[1]) Diese Zeitschr. 31, 505, 1911.

[2]) Ebenda 21, 530, 1909.

[3]) Ebenda 21, 533, 1909.

phyll, so fehlte auch das Allochlorophyllan.[1]) Dem Satz: Die Einheitlichkeit oder die Dualität des Chlorophyllans könne nur auf physikalischem Wege erwiesen werden, kann ich ebensowenig beipflichten wie einer negierenden Stellung dieser Methode gegenüber überhaupt. Ich denke beide Methoden, die physikalische und chemische, ergänzen sich gut, und der wissenschaftliche Wert einer Entdeckung, die auf Grund so total verschiedener Verfahren erhalten wird, ist um so dauerhafter. Zudem ist man jetzt erst, nachdem unsere Methode zur Isolierung des Allochlorophyllans bekannt wurde, in der Lage, über die Natur dieses Produktes etwas ausfindig zu machen, also auch der chemischen Forschung des Allochlorophylls selbst näher zu treten.

Mit Unrecht vergleicht Tswett den Grad des chemischen Eingriffs bei der Bildung der Zinkchlorophylle mit der Wirkung konzentrierter Salzsäure auf Chlorophyllan. Es ist höchst wahrscheinlich, daß bei der Behandlung von Chlorophyllanen mit $Zn(OH)_2 + CO_2$, allein Zink an das Molekül angelagert wird und daß die erhaltenen Produkte, im Gegensatz zu meinen früheren Bedenken, als wahre Zinkchlorophylle zu betrachten sind. Dafür sprechen die weiteren Forschungsergebnisse dieser Körper, die demnächst publiziert werden, wie auch der Umstand, daß Zinkchlorophyll höchstwahrscheinlich auch in der Natur vorkommt. Bekanntlich gedeihen einige Pflanzenarten besonders gut auf zinkhaltigem Boden, z. B. Viola calaminaria. In den Blättern solcher Pflanzen wurde von früheren Forschern Zink vorgefunden, und es ist meiner Ansicht nach sehr wahrscheinlich, daß es dem Zinkchlorophyll entsprang. Einschlägige Versuche, die mit entsprechend kultiviertem Pflanzenmaterial im hiesigen Laboratorium ausgeführt werden, dürften diese Angelegenheit bald entscheiden.

[1]) Ich will mich damit keineswegs gegen den Satz Tswetts wenden, daß alle Samenpflanzen Chlorophyll und Allochlorophyll enthalten. Es ist wohl möglich, daß unsere chemische Methode nur dann positive Resultate gibt, wenn das Allochlorophyllan in einigermaßen beträchtlichen Mengen vorhanden ist.

Kleinere Mitteilungen.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 7. April 1911.)

Inhaltsübersicht.

1. Über das Vorkommen von Traubenzucker und Kreatinin im Hühnerei.

2. Über den Inhalt einer Dermoidcyste.

3. Über einige Eigenschaften des Hämatins.

4. Über die quantitative Bestimmung des Peptons neben Albumosen.

5. Über die quantitative Bestimmung des Schwefels im Harn und die Bedeutung des neutralen Schwefels.

1. Über das Vorkommen von Traubenzucker und Kreatinin im Hühnerei.

Bezüglich des Vorkommens von präformiertem reduzierendem und gärungsfähigem Kohlenhydrat, also präsumptiv Traubenzucker, im Hühnerei, sind in neuerer Zeit Zweifel geäußert worden, die mich zu einigen Bemerkungen über diesen Gegenstand veranlassen.

Was zunächst das Weiße des Eies, das Albumen, betrifft, so rührt die erste Angabe, daß dasselbe Zucker und zwar Traubenzucker enthalte, meines Wissens von C. G. Lehmann her, der in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie 1, 297, 1850 und 2, 355 angibt, daß das Albumen des Eies konstant gärungsfähigen Zucker enthalte. Diese Angabe ist in mehr oder weniger bestimmter Form in die späteren Lehrbücher übergegangen. Da Genaueres hierüber nicht bekannt zu sein schien, nahm ich im Jahre 1893[1]) den Gegenstand wieder auf.

[1]) Centralbl. f. med. Wiss. 1893, 515.

Ich erhielt damals aus dem Weißen des Eies eine eiweißfreie Lösung, die folgende Eigenschaften zeigte: Rechtsdrehung entsprechend 2,4% Glucose, völlige Vergärbarkeit, starke Trommersche Probe, Bildung eines Phenylosazons, das nach dem Trocknen und Waschen mit Äther, erneutem Trocknen bei schnellem Erhitzen bei 204 bis 205° schmolz. Damit war wohl der letzte Zweifel beseitigt und ich nahm keinen Anstand, den Nachweis des Traubenzuckers im Albumen eines Eies als Übungsaufgabe schon in die erste Auflage meines Praktikums der physiologischen und pathologischen Chemie aufzunehmen: er ist seitdem unzählige Male unter meinen Augen durch Gärung und Reduktion geführt worden.

Dieser Tatbestand scheint nicht allgemein bekannt zu sein. Ich schließe das daraus, daß in neuester Zeit meiner Erinnerung nach ein Autor, dessen Namen mir leider entfallen ist, sich dahin geäußert hat, daß das Albumen des Eies „nach alten Angaben Traubenzucker enthalten soll" und es für nötig gefunden hat, sich selbst davon zu überzeugen.

Ganz eigentümliche Ansichten hat in neuester Zeit über diesen Gegenstand Diamare geäußert, wie ich einem von A. Ascoli herrührenden Referat im Centralbl. f. Biochem. u. Biophys. 10, 990 entnehme. Es heißt daselbst: „Der Verfasser beweist, daß sowohl im Eiweiß, als auch im Eigelb des Huhnes der Dialyse fähige Glucose enthalten ist, während man bisher die Glucose als für verbunden, und zwar mit dem Mucoid- oder Lecithalbumin betrachtete: es bleiben noch die Beziehungen zwischen diesem freien Zucker und dem fixierten zu studieren; um so mehr als der Verfasser durch die Hydrolyse des vorher der Dialyse unterworfenen Eiweißes einen anderen Zucker erhielt; aus dem Eigelb hingegen erhielt er keine weiteren Zuckermengen."

Um zu verhüten, daß diese Angaben bzw. ein Teil derselben etwa in die Lehrbücher übergeht, bemerke ich folgendes:

Meines Wissens hat niemals jemand behauptet, daß der Zucker im Albumen nicht frei sei, sondern an Ovomucoid gebunden, es bedurfte also des Nachweises, daß er der Dialyse fähig sei, durchaus nicht. Daß durch das Kochen des verdünnten Hühnereiweißes unter Zusatz von Essigsäure behufs Entfernung des Albumins ein Kohlenhydrat und zwar Glucose aus einem

größeren Atomkomplex abgespalten werden könne — das anzunehmen liegt wohl nicht der geringste Grund vor. Man kann also die Glucose unbedenklich als präformiert ansehen. Um aber jeden Einwand auszuschließen, habe ich noch einen anderen Weg zum Nachweis eingeschlagen: das flüssige Albumen wurde direkt in etwa das 8fache Volumen 95%igen Alkohols gebracht und damit einige Zeit kräftig geschüttelt, das alkoholische Filtrat bei gelinder Wärme verdunstet, der Rückstand in einigen Kubikzentimetern Wasser aufgenommen. Der Erfolg war derselbe: es wurde gärungsfähiger Zucker erhalten. Um zu sehen, ob etwa daneben noch ein anderes nicht gärungsfähiges Kohlenhydrat vorhanden sei, wurde die vergorene Flüssigkeit nach 48 Stunden samt der Hefe in etwa das 8fache Volumen Alkohol absolutus gegossen, nach einigem Stehen filtriert, das alkoholische Filtrat bei gelinder Wärme verdunstet und mit frisch gemischter Fehlingscher Lösung geprüft: es trat keine Reduktion ein. In anderen Fällen wurde die Trommersche Probe direkt an der vergorenen Flüssigkeit angestellt: das Resultat war gleichfalls negativ.

Der „andere" Zucker, den Diamare durch Hydrolyse des vorher der Dialyse unterworfenen Eiweißes erhalten hat, kann nichts anderes als Glucosamin gewesen sein.

Etwas anders ist die Sachlage hinsichtlich des Eidotters. Auch hierüber findet sich schon bei C. G. Lehmann, l. c., 2, 353 eine kurze Angabe bei der Analyse des Dotters: „Die Bestimmung des Zuckers geschieht aus dem fettfreien Alkoholextrakt durch Gärung oder die Fehling-Trommersche Methode." Auch Kühne, Lehrbuch der physiologischen Chemie 1868, 550 führt Traubenzucker als „mit Sicherheit nachgewiesen" an. Ebenso zählt Hammarsten, 7. Auflage, 1910, 595, Glucose „in geringer Menge" unter den Bestandteilen des Dotters auf.

Beim Dotter kann man allenfalls daran denken, daß die Glucose nicht frei vorhanden ist, sondern in einer lockeren Verbindung mit Lecithin, wie sie vielfach im „Jecorin" angenommen wird, oder mit dem noch weniger als chemisches Individuum gesicherten Lecithinalbumin. Eine solche Verbindung wäre freilich keine feste oder „fixe", um mit Ascoli zu sprechen, sondern eine sehr lockere, und ob sie durch Dia-

lyse nicht gelöst werden würde, ob der Nachweis im Dialysat also ganz beweisend sein würde für das „freie" Vorkommen, ist auch zweifelhaft. Immerhin waren die Versuche von Diamare, soweit sie den Dotter betreffen, nicht überflüssig.

Man kann nun aber auch ohne Dialyse durch einfache Extraktion mit Wasser und Äther den Gehalt an gärungsfähigem Zucker nachweisen. Zu dem Zweck verfuhr ich folgendermaßen: Eidotter, in der Regel von 2 Eiern, wurde, mit dem mehrfachen Volumen Wasser geschüttelt, die rahmartige Masse dann mit dem gleichen oder etwas mehr als dem gleichen Volumen Äther, der in der Regel 2 bis 3mal, erneuert wurde, doch genügt auch schon einmaliges Schütteln. Beim Stehenlassen bilden sich allmählich drei Schichten, eine untere ganz klare oder nahezu ganz klare wässerige, eine mittlere, weiße, flockiges Vitellin enthaltende und eine obere gleichfalls klare Ätherschicht. In die untere Schicht ragt meistens noch etwas von den Dotterhüllen zapfenartig aus der mittleren Schicht hinein. Die Absetzung der Schichten erfolgt sehr langsam, man kann sie durch Alkoholzusatz beschleunigen, es geht aber auch ohne das. Die klare wässerige Lösung wird abgelassen und mit dem mehrfachen Volumen Alkohol, am besten absoluten, gemischt, nach längerem Stehen, bis sich das Eiweiß flockig ausgeschieden hat, am besten am nächsten Tage filtriert, der alkoholische Auszug bei gelinder Temperatur verdampft. Die zurückbleibende wässerige Flüssigkeit gibt positive Trommersche Probe und positive Gärungsprobe, jedoch ist die Quantität der Kohlensäure nach 24 Stunden nur etwa $^1/_4$ der aus dem Albumen von 2 Eiern gelieferten, bei längerem Verweilen im Thermostaten nimmt sie zu und beträgt nach 48 Stunden etwa die Hälfte. Der Eidotter enthält also gleichfalls ein gärungsfähiges, reduzierendes Kohlenhydrat, vermutlich Glucose, jedoch in geringerer Quantität als das Eieralbumen. Auch im Dotter wurde auf demselben Wege wie beim Albumen die vergorene Flüssigkeit auf etwaigen Gehalt an CuO in alkalischer Lösung reduzierender Substanz untersucht. Dabei ergab sich, abweichend von dem Eieralbumen, in der Tat Ausscheidung von gelbem Kupferoxydulhydrat, mitunter sogar ziemlich reichliche Ausscheidung. Muß nun diese reduzierende Substanz gerade ein Kohlenhydrat sein? Bei der weiten Verbreitung CuO redu-

zierender Substanzen ist das nicht notwendig. Die Frage ist schwer zu entscheiden. Freilich haben wir für Kohlenhydrate die unvergleichlich feine Molisch-Reaktion mit α-Naphthol- und Schwefelsäure; aber um sie in vorliegendem Falle anstellen zu können, muß erst die Glucose durch Gärung entfernt werden. Läßt man aber vergären, so enthält die vergorene Flüssigkeit nach Neuberg[1]) stets aus verschiedenen Quellen stammende Körper, die die α-Naphthol-Reaktion geben. Ob sich diese beseitigen lassen ohne gleichzeitig etwa noch aus dem Dotter stammende Kohlenhydrate zu eliminieren, ist sehr fraglich.

Nun kommen reduzierende gärungsunfähige Kohlenhydrate, abgesehen vom Milchzucker, der übrigens ja auch nicht unbedingt gärungsunfähig ist, in freier Form im Tierkörper kaum vor — von den Pentosen kann hier abgesehen werden, da sie nicht frei vorkommen, wenigstens nicht normal. Es lag daher nicht fern, an einen anderen reduzierenden Körper zu denken, nämlich an Kreatinin. In der Tat geben die reduzierenden zuckerhaltigen Lösungen, wenn man sie mit Tierkohle ganz oder annähernd entfärbt hat, die Weylsche Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge, nicht sehr stark, aber in unzweideutiger Weise, ebenso die von mir angegebene auf Bildung von Berlinerblau beruhende Grünfärbung resp. Blaufärbung beim nachträglichen Erhitzen mit Eisessig. Ebenso — schwach — die Jaffesche Reaktion mit Pikrinsäure und Natronlauge.

Zur weiteren Feststellung des Kreatinins wurde eine aus 12 Eiern stammende wässerige Lösung stark eingedampft, dann mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, von dem entstandenen Niederschlag abfiltriert, der alkoholische Auszug verdunstet und in Wasser aufgenommen. Da die Möglichkeit bestand, daß etwa vorhandenes Kreatinin während der Bearbeitung in Kreatin übergegangen war, so wurde die 40 ccm betragende Lösung mit 2 ccm verdünnter Schwefelsäure ($= 0{,}4$ g H_2SO_4) versetzt, etwa $^1/_2$ Stunde auf dem Drahtnetz gelinde erhitzt, die Schwefelsäure durch Verreiben mit Bariumcarbonat entfernt, das alkalisch reagierende Filtrat unter Ansäuern mit Essigsäure eingedampft, der bräunliche dickliche Rückstand mit Alkohol extrahiert, filtriert, das Filtrat mit

[1]) Diese Zeitschr. 24, 431, 1910.

Chlorzinklösung versetzt. Am nächsten Tag fand sich am Boden und an den Wänden des Becherglases ein Niederschlag, der bei der mikroskopischen Untersuchung zum Teil amorph erschien, zum Teil aus Krystalldrusen bestand. Der von dem Niederschlag abgegossene alkoholische Auszug gab bis zum nächsten Tage eine weitere Ausscheidung. Immerhin war die Quantität des Kreatininchlorzinks gering, vielleicht abhängig von der Gegenwart von Traubenzucker, dem ältere Autoren[1]) einen störenden Einfluß auf die Ausscheidung des Kreatininchlorzinks zuschreiben. Für die Bestimmung des Kreatinins im diabetischen Harn wurde nach Gäthgens' Vorgang vielfach die vorherige Entfernung des Traubenzuckers durch Gärung angewendet, für den vorliegenden Fall, in dem es sich doch immer nur um sehr geringe Mengen von Kreatinin handelt, hielt ich dies nicht ohne weiteres für zulässig, da auch die Preßhefe Kreatinin zu enthalten scheint.[2])

Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß mir der Nachweis des Kreatinins in 2 Eidotter einmal nicht gelang, allerdings war die Bearbeitung eine etwas andere und nicht ohne Fehler verlaufen. Immerhin ist es möglich, daß das Kreatinin nicht konstant vorkommt. Ganz undenkbar ist das nicht, ist doch auch der Gehalt an Lutein und an Eisen wechselnd.

Es sei hier noch eine nebenher gemachte Beobachtung erwähnt. Bei Anstellung der Probe auf Kreatinin fiel mir auf, daß die Intensität der Grünfärbung resp. Blaufärbung beim nachträglichen Erhitzen mit Eisessig in keinem richtigen Verhältnis zu der durch Nitroprussidnatrium und Natronlauge bewirkten Rotfärbung stand, d. h. sie war viel zu stark. Es zeigte sich nun, daß diese Grünfärbung resp. Blaufärbung und allmähliche Abscheidung von Berlinerblau auch dann auftritt, wenn man die aus dem Eidotter stammende Lösung mit Nitroprussidnatrium versetzt und direkt (ohne vorherige Anwendung von Natronlauge) mit Eisessig erhitzt, was beim Kreatinin nicht der Fall ist, natürlich auch nicht im Kontrollversuch eintritt. Es muß also in der betreffenden Lösung, also auch im Eidotter,

[1]) Vgl. Gäthgens in Hoppe-Seylers Med. chem. Untersuchungen, 1868, 301.

[2]) Ich komme hierauf noch zurück.

ein bisher unbekannter Körper vorhanden sein, der aus Nitroprussidnatrium in essigsaurer Lösung beim Erhitzen Berlinerblau bildet.

2. Über den Inhalt einer Dermoidcyste.

Vor einiger Zeit ging mir aus dem St. Hedwigskrankenhause durch die Freundlichkeit des Direktors der inneren Abteilung, Herrn Sanitätsrat Dr. Wirsing, ein durch Punktion des Abdomens unterhalb des Nabels links davon bei einer 72jährigen Frau entleertes Fett zu.

Bei der einige Monate später gemachten Sektion ergab sich folgende anatomische Diagnose, die ich Herrn Dr. Rheindorf verdanke: Gallertcarcinom der Typhlongegend mit Einwachsen in das Lig. latum rechts und den Uterus, zahllose peritoneale Metastasen und Milzmetastasen. Jauchiger Abscess hinter dem Typhlon mit Fistelgang in die Gegend des rechten Ligamentum Pouparti. Braunes, schlaffes Herz mit gallertiger Degeneration des Fettgewebes. Recurrierende Endocarditis mitralis et aortae. Eitrige Bronchitis beiderseits mit Kollaps und fibrinöser Pleuritis. Niereninfract links, geringe Pyonephrose beiderseits (Kompression durch Faecesmassen im kleinen Becken). Cystitis. Halbmannskopfgroße Dermoidcyste des linken Ovariums.

Von dem Inhalt der Cyste, aus der auch das während des Lebens durch Punktion erhaltene Fett stammte, wurde mir ein — leider nur kleiner — Teil zur Untersuchung übergeben.

Der Vollständigkeit wegen führe ich auch das Resultat der von Dr. Benno Brahn ausgeführten Untersuchung des Fettes der Cyste an, obwohl sich dabei keine erheblichen Abweichungen von der Norm ergaben.

Die Normalzahlen nach S. Fränkel's Deskriptiver Biochemie S. 13, sind in Parenthese beigefügt.

Menge des Fettes 148 g.

Farbe gelb, Konsistenz ziemlich steif.

Schmelzpunkt — an einer größeren Menge Fett im Reagensglas bestimmt — 20 bis 21° (17,5°).

Erstarrungspunkt 18 bis 19° (15°).

Säurezahl 0,75[1]) (0,003 bis 0,062%, Leberfett 1,4482%).

Verseifungszahl 153[2]) (193 bis 204).

Esterzahl 152.

Reichert-Meißlsche Zahl[3]) (flüchtige Fettsäuren) 0,44 (0,25 bis 2,12).

---

[1]) 6,0 g verbrauchten in 2 Versuchen je 0,8 ccm $^n/_{10}$-Kalilauge.

[2]) 1,1714 g verbrauchten zur Neutralisation 3,2 ccm $^n/_{10}$-Kalilauge.

[3]) 5,0 g verbrauchten nach der Destillation 0,4 ccm $^n/_{10}$-Kalilauge.

Cholesteringehalt. Aus 50 g Fett wurden möglichst unter quantitativen Kautelen 0,304 g Cholesterin vom Schmelzpunkt 141 bis 142° erhalten = 0,608% (normal 0,3%). Durch nochmaliges Umkrystallisieren verminderte sich das Cholesterin auf 0,250 g vom Schmelzpunkt 147°.

Aus dem mir zur Untersuchung übergebenen Inhalt der Dermoidcyste wurden durch Extraktion mit Äther 19 g Fett (Ätherextrakt) erhalten, das durch längeres Erhitzen auf dem Wasserbad von Äther befreit war. Dasselbe wurde nach dem Verfahren behandelt, das ich zur Verseifung der Fette und Isolierung der unverseifbaren Substanzen in denselben beschrieben habe.[1]) Der ätherische Auszug nach dem Verseifen hinterließ einen relativ reichlichen halbfesten Rückstand, der keine Neigung zur Krystallisation zeigte. Durch Extraktion desselben mit heißem Alkohol und starkes Abkühlen der etwas eingeengten Alkohollösung wurden 0,201 g Cholesterin erhalten. Die rückständige, eingedampfte alkoholische Lösung wurde nochmals der Verseifung in der üblichen Weise unterworfen und mit Äther ausgeschüttelt. In der wässerigen alkalischen Lösung waren keine Fettsäuren nachweisbar. Die ätherische Lösung hinterließ eine bräunliche, schmierige Masse. Da immer noch die Möglichkeit vorlag, daß sie unangegriffene Cholesterinester enthielt, wurde die Substanz nochmals in der Wärme mit Natriumalkoholat behandelt, dann noch einige Tage stehen gelassen und wiederum mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther hinterließ nunmehr 2,390 g Unverseifbares = 12,58% des „Fettes".

Das Unverseifbare gab in der ausgeprägtesten Weise alle Cholesterinreaktionen, mußte also immer noch aus Cholesterinestern oder überwiegend aus solchen bestehen.

An einer behufs Anstellung der Liebermannschen Cholestolreaktion in Essigsäureanhydrid unter Erhitzen gelösten Probe bemerkte ich nun, daß sie beim Erkalten eine körnig-krystallinische Ausscheidung gab, die sich mikroskopisch in „Stechapfelformen" darstellte. In der Hoffnung, auf diesem Wege eine Trennung bewirken zu können, löste ich daraufhin die Hauptquantität in Essigsäureanhydrid in der Wärme. Leider war der Erfolg nicht derselbe wie in der kleinen Probe, es trat

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 515, 1908.

vielmehr eine ölige Ausscheidung auf, die erst nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank fest wurde. Vermutlich war das Verhältnis zwischen Substanz und Essigsäureanhydrid nicht richtig getroffen. Schon beim Abfiltrieren wurde die Substanz zum Teil wieder ölig. Es wurde mit Essigsäureanhydrid nachgewaschen.

a) Der so erhaltene Rückstand wurde durch Aufgießen von Chloroform gelöst. Die Chloroformlösung, auf dem Wasserbad verdunstet, war am nächsten Tage zu einem Krystallbrei erstarrt, der auch bei längerem Stehen sich nicht verflüssigte. Derselbe ergab sich bei der mikroskopischen Untersuchung als aus äußerst feinen, schwach lichtbrechenden Nadeln bestehend. Dazwischen aber waren in geringer Menge derbe, dem Kreatininchlorzink aus Harn ähnliche Krystalldrusen eingestreut, die Substanz war also nicht ganz einheitlich, wenn auch die Nadeln außerordentlich überwogen. Die Substanz gab ausgeprägte Liebermann-Burckardsche Reaktion, nicht so gute Chloroform-Schwefelsäurereaktion, indessen doch alle Erscheinungen derselben. Um noch etwas mit der Substanz anzufangen, machte ich den Versuch, sie durch konzentrierte Schwefelsäure zu verseifen. Sie wurde also in Schwefelsäure gelöst, wobei starke Bräunung eintrat, die Lösung ohne längeres Verweilen in Alkohol eingegossen. Beim Stehenlassen der Alkohollösung schied sich in geringer Menge ein gelblicher Niederschlag aus, der mikroskopisch durchaus einheitlich aus leucinähnlichen Kugeln bestand.

Ein Teil der abfiltrierten und gut mit Alkohol gewaschenen, an der Luft getrockneten Substanz wurde in Chloroform gelöst und beim Verdampfen des Chloroforms in einem Glasschälchen als spröde, harte Masse erhalten. Beim Erhitzen des Schälchens im Trockenschrank auf 140 bis 145° trat keine Veränderung ein.

Von den Eigenschaften erwähne ich noch: Staubiges, gelbes, nicht klebriges Pulver, unlöslich in Wasser, auch nach Zusatz von Na_2CO_3 und NaOH, beim Kochen damit nicht schmelzend. Beim Erhitzen des Pulvers in einem beiderseits offenen Rohr tritt Schmelzung ein unter Verbreitung eines eigentümlichen aromatischen Geruchs. Die Substanz ist unlöslich in Alkohol, löslich in Chloroform sowie in Essigsäureanhydrid. Bei Anstellung der Liebermann-Burckardschen Reaktion Violett-

färbung, die bald schmutzigbraun wird, keine Blau- oder Grünfärbung. Die Chloroform-Schwefelsäurereaktion fast negativ: das Chloroform orange, die Schwefelsäure ohne Fluorescenz.

Die Alkohollösung in Wasser gegossen: milchige Trübung, jedoch auch bei längerem Stehen kein Niederschlag, auch durch Kochsalzzusatz keine Ausflockung zu erzielen. Da sich die milchige Trübung beim Schütteln mit Äther nur wenig aufhellt, wird die weitere Untersuchung aufgegeben.

b) Die Essigsäureanhydridlösung (siehe oben), auf dem Wasserbad eingedampft, liefert ein Öl, das auch nach langem Stehen im Eisschrank nicht erstarrt. Das Öl gibt ausgeprägte Liebermann-Burckardsche Reaktion, schlechte Chloroform-Schwefelsäurereaktion. Das Öl wird in Schwefelsäure gelöst, die Lösung in Alkohol eingegossen. Am nächsten Tage gelber Niederschlag, der mikroskopisch aus Knollen besteht. Der Niederschlag, mit Alkohol gewaschen, war etwas klebrig, zur Schmelzpunktbestimmung nicht geeignet.

Von den Eigenschaften sei erwähnt:

Beim Erhitzen mit Wasser erweichend, unlöslich darin. Gleiches Verhalten nach Zusatz von Na_2CO_3 bzw. NaOH. Beim Kochen mit Alkohol schmelzend, wenig löslich, die Lösung gibt keine Reaktion mit Rhamnose und Schwefelsäure nach Neuberg und Rauchwerger, löslich in Essigsäureanhydrid sowie in Chloroform. Bei der Liebermann-Burckardschen Reaktion schmutzig-violette Färbung, jedoch weder Blau noch Grün. Chloroform-Schwefelsäurereaktion: Schwefelsäure braunrot ohne Fluorescenz, Chloroform orange.

Die alkoholische Lösung in Wasser gegossen: starke weiße Trübung, die sich allmählich zu einem Niederschlag zusammenballt. Es wird filtriert und mit Wasser nachgewaschen. Die Masse trocknet auf dem Filter an. Stücke des Filters werden zur Feststellung des Verhaltens benutzt. Die Substanz erweist sich unlöslich in heißem Wasser, auch nach Zusatz von Na_2CO_3 resp. NaOH, löslich in Alkohol sowie in Chloroform. Die Lösungen geben keine Cholesterinreaktionen.

E. Ludwig[1]) hat in dem Fett der Dermoidcysten Cetylalkohol gefunden, Zeyneck[2]) diesen Befund bestätigt, im

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 38.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 41.

übrigen bei der Untersuchung großer Mengen des Fettes die Gegenwart anderer, dem Cholesterin ähnlicher Körper wahrscheinlich gemacht, jedoch keine chemischen Individuen isolieren können. Meine Beobachtungen haben gleichfalls kein abschließendes Resultat ergeben, indessen war ein solches bei der sehr geringen Menge der mir zu Gebote stehenden Substanz — nur 2,4 g, während Zeyneck mindestens 370 g unverseifbare Substanz in Händen gehabt hat (l. c. S. 47) — auch nicht zu erwarten; immerhin habe ich krystallisierte Körper — vielleicht Essigester? — isolieren können und darf wohl hoffen, daß spätere Forscher von meinen Befunden mit Vorteil Gebrauch machen könnten. Das ist der Grund, warum ich diese unvollständigen Beobachtungen mitteile.

3. Über einige Eigenschaften des Hämatins.

Bekanntlich ist über die Frage, welchem Körper das Blut seine Eigenschaft, Wasserstoffsuperoxyd zu katalysieren, verdankt, keine Einigkeit erzielt worden. Während Alexander Schmidt und nach ihm manche neueren Forscher das Oxyhämoglobin selbst als katalysierenden Körper ansehen, Bergengrün die Stromata resp. Hüllen der Blutkörperchen, konnte Senter[1]) aus dem Blut eine von Blutfarbstoff freie Lösung herstellen, die die Eigenschaft, Wasserstoffsuperoxyd zu katalysieren, in hohem Grade zeigte. Senter hat dieses Ferment Hämase genannt. Ich habe in einer früheren Arbeit[2]) gezeigt, daß die Eigenschaft des Blutes, H_2O_2 zu zerlegen, durch Erwärmen auf 69 bis 70° verloren geht. Da der Blutfarbstoff bei dieser Temperatur nur unwesentlich verändert wird, die Hämase Senters dagegen nach seiner Angabe bei 65° ihre Wirksamkeit verliert, könnte man in diesem Verhalten des Blutes eine Bestätigung der Ansicht sehen, daß die katalysierende Eigenschaft des Blutes allein von dem Gehalt an Hämase abhängt. Nun existiert aber eine mir seit langen Jahren bekannte, allgemein aber, wie es scheint, ganz unbekannte Tatsache, die zeigt, daß der eisenhaltigen Farbstoffgruppe des Hämoglobins katalysierende Eigenschaften zukommen, nämlich die Tatsache, daß Hämatin selbst kataly-

[1]) Zitiert nach Malys Jahresber. 23, 108, 1903.

[2]) Diese Zeitschr. 19, 106.

sierend wirkt, wenn auch die Intensität der Wirkung geringer ist als die des frischen Blutes.

Ich benutzte zu meinen Versuchen zunächst sog. Verdauungshämatin (Zeyneck[1]). Dasselbe war durch Pepsinverdauung, und zwar teils aus Oxyhämoglobin, teils — hauptsächlich — aus Blut direkt erhalten.

Bei den Versuchen mit Oxyhämoglobin gelang eine glatte Abscheidung des Hämatins durch die Verdauung nicht,[2]) dasselbe war vielmehr so außerordentlich fein suspendiert, daß ein großer Teil die Filter passierte und es eines Zusatzes von Chlorcalcium und Natriumcarbonat bedurfte, um wenigstens den größten Teil des Hämatins zurückzuhalten. Das auf dem Filter gebliebene ungereinigte Hämatin, sowie der Calciumcarbonat enthaltende Brei wirkten auf H_2O_2 katalysierend.

Da Angaben über das Verhalten des Globins bei kurzdauernder — 48stündiger — Verdauung nicht vorzuliegen scheinen, habe ich die Gelegenheit benutzt, um das Verhalten der aus dem Hämoglobin durch Verdauung erhaltenen Lösung zu Reagenzien zu untersuchen. Eine solche Lösung, aus der die letzten Reste von Hämatin durch Kohle entfernt waren, zeigte bei einer Konzentration von ca. 1,2% folgendes Verhalten:

1. Erhitzen zum Sieden: ganz klar, auch nach Zusatz von Essigsäure und Kochsalz.
2. Essigsäure + Kochsalz kalt: ganz klar.
3. Ammonsulfat bis zur Sättigung bei saurer Reaktion: Spur Trübung.
4. $CuSO_4$: 0.
5. $K_4Fe(CN)_6$ + Essigsäure: 0.
6. Kochen mit bleiacetathaltiger Natronlauge: fast negativ, geringe Graufärbung und Trübung.
7. Adamkiewiczreaktion mit Glyoxylsäure: stark positiv.
8. Biuretreaktion: stark rot.
9. Erwärmen mit HNO_3: gelblich, nach Zusatz von NaOH citronengelb.
10. Millons Reaktion: fast negativ.
11. α-Naphtholreaktion: negativ.

Das Verdauungsprodukt hat also schon nach ca. 48stündiger Einwirkung der Pepsin-Salzsäure den Charakter von Pepton resp. von Deuteroalbumose. Primäre Albumosen sind nicht nachweisbar, für die Gegenwart von Deuteroalbumose spricht nur das Verhalten zu Ammon-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 126, 1900, und 49, 472, 1903.

[2]) Allerdings hatte ich aus bestimmten Gründen die Verdauung nur 48 Stunden dauern lassen.

sulfat. Sehr bemerkenswert ist der fast negative Ausfall der Millonschen Reaktion, entsprechend dem geringen Gehalt des Hämoglobins an Tyrosin nach Abderhalden[1]). Allerdings kommt hierbei auch wohl der nicht unerhebliche Gehalt der Lösung an Chloriden in Betracht, die nach früher von mir mitgeteilten Beobachtungen unter Umständen die Millonsche Reaktion ganz verhindern können.

Die Lösung erwies sich, wie nicht anders zu erwarten, linksdrehend, und zwar drehte eine Lösung, deren N-Gehalt 0,3178% betrug, bei Natriumlicht 0,64°. Legt man der Umrechnung auf Eiweiß den von N. Schultz[2]) ermittelten N-Gehalt des Globins = 16,89% zugrunde, so würde sich α_D zu 55,35 berechnen.

Der größte Teil des zu den Versuchen benutzten Hämatins war — wie gesagt — aus Blut (Rinderblut und Schweineblut) direkt dargestellt. Die Verdauungsversuche liegen sehr weit zurück: ich habe sie schon vor einer Reihe von Jahren als Vorversuche bei meinen Fütterungsversuchen[3]) mit Hämoglobin und Blutkoagulum angestellt.

Das Blut wurde in das 20fache Volumen künstlichen Magensaft[4]) gegossen (in einigen Versuchen 50 ccm Blut und 1 l Pepsinsalzsäure, in anderen 250 ccm Blut und 5 l Pepsinsalzsäure), die Mischung im Thermostaten bei 40° digeriert. Die ursprünglich gleichmäßig braune Flüssigkeit schied sich dann stets in einen dunkelbraunen Niederschlag und eine hellgelbe bis dunkelgelbe, mitunter aber auch bräunliche Lösung. Die Zeit, innerhalb der dies eintrat, war sehr verschieden, mitunter 3, ja selbst 2 Tage, in anderen Fällen war wochenlange Digestion erforderlich. Wenn ich den vorliegenden Angaben über die Herstammung des Blutes vertrauen kann, war das erstere bei Rinderblut, das zweite bei Schweineblut der Fall, indessen kann ich eine Verantwortung für die Richtigkeit dieser Angaben nicht übernehmen.

Zur Darstellung des Hämatins wurde die klare, gelbe Lösung zunächst abgehebert. Über die Verdauungsprodukte möchte ich hier nur kurz bemerken, daß schon nach 2tägiger Digestion ein großer Teil durch Ammonsulfat nicht fällbar war.[5]) Die rückständige Flüssigkeit wurde

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 492, 1902/03.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 465, 1898.

[3]) Diese Zeitschr. 19, 883, 1909. Die Fütterungsversuche selbst sind lange vor der Publikation angestellt.

[4]) Zur Herstellung wurden 2 g Pepsin Finzelberg durch Auswaschen von Milchzucker befreit, mit einer Mischung von 990 ccm Wasser und 10 ccm Salzsäure = 1,124 D. vom Filter gespritzt, nach 1tägigem Stehen bei Zimmertemperatur filtriert.

[5]) Zur Kontrolle wurde auch Blut mit verdünnter Salzsäure derselben Konzentration ohne Pepsin digeriert: die erhaltene Albumoselösung enthielt nicht nachweisbar Pepton.

filtriert, der Niederschlag bis zu fast völligem Verschwinden der HCl-Reaktion gewaschen, auf dem Filter in verdünntem Ammoniak gelöst, die Lösung mit Salzsäure ausgefällt, ausgewaschen, durch Waschen mit Alkohol und Äther entwässert und entfettet, das ätherfeuchte Präparat trocken gerieben. Man erhielt so ein zartes, braunschwarzes Pulver.[1] Ein Teil dieses Pulvers wurde nochmals in Ammoniak gelöst und auf dem Wasserbade zur Trockne gedampft.[2] Dieses Präparat stellte eine schwarze, glitzernde Masse dar. Zu den Versuchen mit feuchtem Hämatin wurde dieses in Natronlauge gelöst und mit Salzsäure gefällt, ausgewaschen.

Die Versuche ergaben nun folgendes:

1. Übergießt man feuchtes Hämatin mit H_2O_2, so tritt eine lebhafte Entwicklung von Sauerstoff ein.

2. Gießt man H_2O_2 in die alkalische Lösung (mit NaOH), so tritt eine stürmische Entwicklung ein.

3. Geringer erscheint die Zersetzung bei Anwendung einer Lösung des Hämatins in Eisessig, jedoch kann ich dies nicht bestimmt behaupten, da die angewandten Hämatinmengen willkürlich gewählt wurden, quantitative Versuche würden diese Angabe vielleicht nicht bestätigen.

In allen Fällen trat allmählich eine mehr oder weniger weitgehende Entfärbung ein, anscheinend schneller in der eisessigsauren Lösung, in Übereinstimmung damit, daß diese Lösung schwächer katalysierte. Die gelb gewordenen Lösungen enthalten ionisiertes Eisen.

---

[1]) De Grazia hat (diese Zeitschr. 16, 277) angegeben, daß das durch Verdauung aus Blut erhaltene Hämatin nur 4 bis 5% N enthalte. Mein Präparat ergab bei der N-Bestimmung nach Dumas wie das von Zeyneck ungefähr normalen Gehalt. 0,1960 g gaben 17,0 ccm N bei 15° und 759 mm B. Daraus berechnet sich der N-Gehalt = 10,00% (erfordert für $C_{34}H_{33}N_5FeO_5$ nach Zeyneck 10,79%).

[2]) Nach den vorliegenden Angaben soll dieses Präparat hartnäckig Ammoniak zurückhalten, was bei dem Säurecharakter des Hämatins auch sehr erklärlich wäre. Ich habe mich bei meinem Präparat davon nicht überzeugen können: es entwickelte beim Erhitzen mit Natronlauge kein Ammoniak. Zur genaueren Untersuchung wurde eine kleine Quantität in Natronlauge gelöst, mit Salzsäure ausgefällt. Im Filtrat war nach den üblichen Methoden kein Ammoniak nachweisbar, auch Neßlersches Reagens bewirkte in dem alkalisierten Filtrat nur eine leichte Gelbfärbung. Ein irgend erheblicher Gehalt an Ammoniak ist also jedenfalls nicht konstant, es wird wohl viel auf die Dicke der Schicht beim Abdampfen ankommen und auf die Zeitdauer der Trocknung.

Im Hinblick auf die zwischen Küster[1]) und Manchot[2]) bestehende Meinungsdifferenz über die Wertigkeit des Eisens im Hämoglobin schien es mir von Interesse, festzustellen, wie sich die durch H_2O_2 zersetzten Hämatinlösungen in dieser Beziehung verhalten. Es ergab sich folgendes:

Unterstützt man die Einwirkung des H_2O_2 durch Erwärmen bis zur vollständigen Zersetzung des Hämatins, so erhält man in der mit Salzsäure angesäuerten Lösung nur mit Ferrocyankalium Blaufärbung resp. allmählich blauen Niederschlag, mit Ferricyankalium keine Reaktion oder nur eine ganz unbedeutende. Ebenso verhält sich die essigsaure Lösung (dabei ist zu bemerken, daß die essigsaure Lösung gut abgekühlt sein muß, denn heiße Essigsäure, auch 50%ige, wirkt zersetzend auf Ferro- und Ferricyankalium ein, noch weit mehr tut dies ein heißes Gemisch gleicher Teile von Eisessig und H_2O_2).

Das kann nicht wundernehmen, da etwa vorhandenes Ferrosalz durch H_2O_2 unter diesen Umständen jedenfalls zu Ferrisalz oxydiert werden muß. Anders dagegen, wenn man eine zur völligen Oxydation unzureichende Quantität H_2O_2 anwendet, so daß — falls man in alkalischer Lösung oxydiert — beim Ansäuern mit HCl noch Hämatin ausfällt. Setzt man zu der filtrierten Lösung Ferricyankalium, so tritt wohl regelmäßig Blaufärbung auf, daneben aber auch, was sehr erklärlich ist, mit Ferrocyankalium, mitunter scheint mehr Ferro- als Ferrisalz vorhanden zu sein. In der essigsauren Lösung ist die Feststellung des Sachverhaltes etwas schwieriger, weil man die Reaktion anstellen muß, wenn die Lösung noch etwas bräunlich ist, aber auch hier gelingt es — wenigstens oft — Ferrosalz nachzuweisen.

Diese Beobachtungen sprechen augenscheinlich sehr zugunsten der Ansicht von Küster, daß das Eisen im Hämatin in der Ferroform vorhanden ist und nicht, wie Manchot meint, in der Ferriform, da an eine Umwandlung der Ferriform in die Ferroform bei dieser Reaktion wohl nicht zu denken ist.

Die Versuche mit aus Hämin[3]) dargestelltem Hämatin hatten ganz dasselbe Resultat, nur schien es, als ob dasselbe

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 100, 1911.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 230, 1910.

[3]) Nach Nencki dargestellt.

weniger stark katalysiere. Hierüber müßten erst genauere Versuche angestellt werden.

Unter Umständen kann man die Abspaltung von Eisen aus dem Hämatin durch H_2O_2 dazu benutzen, um die Frage zu entscheiden, ob die bräunliche Färbung einer Lösung von Hämatin herrührt, andererseits bietet sie ein bequemes Mittel zur Demonstration des Eisengehaltes des Blutes. Man verfährt dabei zweckmäßig folgendermaßen:

In ca. 5 ccm Eisessig, der sich in einem geräumigen Reagensglas oder in einem kleinen Erlenmeyerkölbchen befindet, tropft man 20 Tropfen Blut, löst dasselbe durch Schütteln und gelindes Erwärmen, setzt dann das gleiche Volumen 3%iges Wasserstoffsuperoxyd hinzu und erhitzt bis die Lösung hellgelb geworden ist, eventuell setzt man noch etwas Wasserstoffsuperoxyd hinzu und kühlt dann gut ab. Bei Zusatz von Ferrocyankalium tritt Blaugrünfärbung ein, die sich auf dem weißen Hintergrund der gleichzeitig ausfallenden Ferrocyanwasserstoffsäure-Eiweißverbindungen gut abhebt.

Man kann die Oxydation natürlich auch in alkalischer Lösung vornehmen und diese mit Salzsäure ansäuern, indessen ist in dieser die stärkere Schaumbildung öfters lästig und störend. Vielleicht läßt sich auf die Einwirkung von H_2O_2 auf den Blutfarbstoff auch ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Eisens im Blut ohne Veraschung gründen.

4. Über die quantitative Bestimmung des Peptons neben Albumosen.

Handelt es sich darum, in einem Gemisch von Albumosen und Pepton den relativen Gehalt an beiden Körpern festzustellen, so wird zurzeit wohl allgemein das Verfahren von A. Bömer[1]) bzw. K. Baumann und A. Bömer[2]) benutzt, nach dem in einer abgemessenen Quantität der Lösung, deren N-Gehalt bekannt ist, die Albumose durch Sättigung mit Zinksulfat nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure (2 ccm auf 100 ccm Flüssigkeit) gefällt und abfiltriert wird. Man kann nun entweder den N-Gehalt des Niederschlages be-

[1]) Zeitschr. f. anal. Chem. 34, 562, 1895.

[2]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 1, 106, 1898. Vgl. auch Ernst Rosenberg, Zeitschr. f. klin. Med. 56, 1905.

stimmen, der dann natürlich sorgfältig mit angesäuerter Zinksulfatlösung gewaschen werden muß. Durch Subtraktion des N-Gehaltes desselben von dem Gesamt-N-Gehalt erfährt man den auf Pepton zu beziehenden N-Wert. Oder man bestimmt den N-Gehalt in einem aliquoten Teil des Filtrates, wobei natürlich die Volumzunahme berücksichtigt werden muß, welche die Flüssigkeit durch die Auflösung des Zinksulfats erfährt.

Zur Erleichterung der Rechnung empfiehlt es sich, mit gesättigter Zinksulfatlösung auf ein rundes Volumen (ausschließlich des am Boden liegenden ungelösten Zinksulfates) etwa 200 ccm aufzufüllen.[1])

Das zweite Verfahren ist wohl mehr im Gebrauch, und zwar aus verschiedenen Gründen: 1. führt es schneller zum Ziel, weil das lästige Auswaschen fortfällt, das übrigens in seiner Wirkung zweifelhaft ist, da die Zinksulfatlösung doch nicht recht in die klumpige Albumose eindringt und weil die Aufschließung durch die Schwefelsäure beim Kjeldahlisieren bei dem Überwiegen der Albumose über das Pepton, das ja die Regel bildet, nicht so lange dauert; 2. empfiehlt es sich, die kleinere Größe — das ist ja fast ausnamslos das Pepton — direkt zu bestimmen und nicht durch Differenz[2]).

Allerdings ist das zweite Verfahren mit einem unvermeidlichen Fehler behaftet: wie bei allen ähnlichen Verfahren wird das Volumen des Niederschlages = 0 gesetzt. Indessen kommt das nicht sehr in Betracht, da das ganze Verfahren überhaupt nicht auf absolute Genauigkeit Anspruch machen kann, schon aus dem Grunde nicht, weil der Peptongehalt durch Multiplikation des N-Gehaltes mit 6,25 ermittelt wird, dieser Faktor

---

[1]) Ich benutze die Gelegenheit, um eine falsche Angabe zu berichtigen, die in einer seinerzeit von Arnheim unter meiner Leitung ausgeführten Arbeit (Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 230) infolge eines Versehens meinerseits stehengeblieben ist. Arnheim sagt in derselben, daß er die Mischung durch Wasser auf ein rundes Volumen aufgefüllt habe. Das ist selbstverständlich nicht geschehen, sondern Arnheim hat dazu Zinksulfatlösung genommen. Da zwischen der Ausführung der Arbeit und der Publikation aus äußeren Gründen lange Zeit verstrichen war, hat Arnheim dies nicht mehr im Gedächtnis gehabt.

[2]) Außerdem ist es recht schwierig, ja mit absoluter Genauigkeit überhaupt kaum möglich, die Albumose vollständig auf das Filter zu bringen.

aber lediglich der Bequemlichkeit halber vereinbart ist und bekanntlich keineswegs immer zutrifft. Voraussetzung des ganzen Verfahrens ist selbstverständlich, daß die betreffende Lösung außer Albumosen und Pepton keine anderen N-haltigen Körper enthält.

Die Fällung mit Zinksulfat macht man meistens in einem graduierten Stöpselzylinder, um das Zinksulfat durch Schütteln lösen und andererseits das Volumen der Mischung ohne Umgießen feststellen zu können, bzw. mit gesättigter Zinksulfatlösung auf ein rundes Volumen auffüllen zu können. Dabei kommt es nun öfters vor, daß ein Teil der Albumosen, mitunter sogar der größere Teil, sich in dem oberen, nicht graduierten Abschnitt des Meßzylinders festsetzt und so der Messung entgeht. Es empfiehlt sich dann die anhängende Albumose mit Alkohol herunterzuspritzen. Der Alkohol mischt sich nicht mit der Zinksulfatlösung, sondern schwimmt obenauf, braucht also auch bei der Messung nicht berücksichtigt zu werden.

Das wiederholte Einbringen von Zinksulfat in den meist ziemlich enghalsigen Mischzylinder, sowie das vielfache Schütteln hat nun unleugbar seine Unbequemlichkeit, ich ziehe deshalb ein anderes Verfahren vor.

Man löst in 100 ccm der Flüssigkeit unter ganz gelindem Erwärmen so viel Zinksulfat auf, daß die Lösung in der Kälte gesättigt ist resp. beim Stehenlassen bis zum nächsten Tage etwas Zinksulfat auskrystallisiert.

Über die hierzu erforderliche Quantität habe ich mich durch Vorversuche unterrichtet, die natürlich nicht den Anspruch erheben, Löslichkeitsbestimmungen darzustellen, sondern nur feststellen sollen, wieviel Zinksulfat unter den gegebenen Verhältnissen erforderlich ist. Es hat sich herausgestellt, daß sich in 100 ccm mit 2 ccm verdünnter Schwefelsäure angesäuertem Wasser 125 g Zinksulfat nur eben auflösen (unter ganz gelindem Erwärmen). Am nächsten Tage findet man in dem Meßzylinder, in den die Lösung übertragen wird, schon einige Zinksulfatkrystalle. Läßt man die Lösung in der Schale stehen, so ist auch an der Oberfläche schon etwas Zinksulfat ausgeschieden. Diese Quantität ist also jedenfalls ausreichend. Über die vorgeschriebene Konzentration der verdünnten Schwefelsäure könnte man im Zweifel sein. In der ersten Mitteilung von Bömer, l. c., S. 564 heißt es: „1 Teil konzentrierte Schwefelsäure + 4 Teile Wasser". Danach sollte man wohl Gewichtsteile annehmen, es sind aber Volumteile gemeint, wie aus der zitierten

Arbeit von K. Baumann und A. Bömer hervorgeht. Auch hier ist allerdings nur gesagt „verdünnte Schwefelsäure (1 + 4)", es findet sich aber außerdem die Bemerkung „so daß die Flüssigkeit etwa 0,4 Vol.-% Schwefelsäure enthält", also sind Volumteile gemeint. Dies hat auch Zunz[1]) angenommen. Ursprünglich hat Bömer den Zusatz von Schwefelsäure nur gemacht, um das Ausfallen von Zinkphosphat zu verhindern — es ist übrigens nicht abzusehen, was dies der Bestimmung schaden soll, in der zweiten Abhandlung macht Bömer selbst diese Bemerkung —, erst später ist der Gedanke aufgetaucht, ob das Ansäuern nicht eine notwendige Bedingung für die vollständige Ausfällung der Albumose ist. Nach den von K. Baumann und Bömer hierüber angestellten Versuchen ergab sich in der Tat, daß die Ausfällung ohne Ansäuern der Lösung unvollständig ist. Aus diesem Grunde ist auch die Erörterung über die Frage, was unter verdünnter Schwefelsäure 1 + 4 zu verstehen sei, nicht überflüssig, denn es ist nicht nachgewiesen, daß bei Anwendung von 2 ccm verdünnter Schwefelsäure 1:4 dem Gewichte nach auf 100 ccm Flüssigkeit die Albumose vollständig gefällt wird. Beiläufig bemerkt, geht aus einer über die Anwendung größerer Mengen verdünnter Schwefelsäure mitgeteilten Versuchsreihe hervor, daß der Zusatz ohne Schaden bis 8 ccm auf 100 Flüssigkeit steigen darf, erst bei 10 ccm bleibt Albumose in Lösung.

Man verfährt nun also zweckmäßig folgendermaßen: Zu 100 ccm der 2 bis 3%igen Albumosepeptonlösung, die sich in einer Schale befindet, setzt man 125 g feingepulvertes krystallisiertes Zinksulfat ($ZnSO_4 + 7H_2O$), löst unter starkem Umrühren und ganz gelindem Erwärmen, wobei sich schon Albumosen abscheiden. Mit Hilfe gesättigter Zinksulfatlösung bringt man alles in einen offenen Meßzylinder von 200 bis 250 ccm, läßt bis zum nächsten Tage stehen, füllt dann mit gesättigter Zinksulfatlösung bis auf 200 bzw. 250 ccm auf, wobei das am Boden schon befindliche Zinksulfat nicht gerechnet wird, und filtriert durch ein nicht angefeuchtetes Filter.

Bestimmt man nun den Stickstoff im Filtrat nach Kjeldahl, so macht sich sehr häufig der Übelstand unangenehm bemerkbar, daß die Flüssigkeit infolge der Ausscheidung von festem Zinksulfat stark stößt. Nicht selten geht dabei die Bestimmung durch Herausspritzen von Flüssigkeit oder durch Springen des Kolbens verloren, aber wenn das auch nicht der Fall ist, ist das Stoßen doch immer sehr beunruhigend.

K. Baumann und Bömer haben allerdings festgestellt, daß man das Pepton aus der Zinksulfatlösung nach weiterem An-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 220, 1899.

säuern mit Schwefelsäure durch Phosphorwolframsäure ausfällen und in dem Niederschlag den N bestimmen kann, aber auch das ist eine unangenehme Prozedur.

Es liegt nun die Frage sehr nahe, ob es nicht möglich ist, alles Zink oder doch den größten Teil desselben vor dem Erhitzen mit Schwefelsäure zu entfernen. Von vornherein ist es klar, daß hieran nur zu denken ist, wenn man sich mit der N-Bestimmung in einem sehr kleinen Teil des Filtrates begnügt. Meiner Ansicht nach reichen hierzu bei der großen Genauigkeit der Kjeldahlbestimmung meistens 10 ccm des Filtrates aus, wenn man $^n/_5$- oder $^n/_{10}$-Säure vorlegt und mit $^n/_{10}$-Lauge zurücktitriert. Ferner ist es selbstverständlich, daß die 10 ccm stark verdünnt werden müssen. Ich habe bei den Versuchen über die in Rede stehende Frage die 10 ccm Filtrat mit 190 Wasser verdünnt.

Auf welchem Wege kann man nun das Zink entfernen und ist dies überhaupt ohne Verlust von Pepton möglich?

Zunächst möchte ich erwähnen, daß dies auf einem sehr einfach erscheinenden Wege nicht geht. Versetzt man das in angegebener Weise verdünnte Filtrat mit Barytwasser, so wird dadurch das Zink als Hydroxyd und gleichzeitig die Schwefelsäure als Bariumsulfat entfernt, das Filtrat sollte nach gutem Auswaschen alles Pepton enthalten. Das ist aber nicht der Fall, das Pepton bleibt vielmehr, mag man noch so lange waschen, zum großen Teil in dem Niederschlag, ja bei geringem Gehalt an Pepton kann es sogar vorkommen, daß im Filtrat gar kein Pepton vorhanden ist oder nur Spuren.

In welcher Weise das Pepton gebunden ist, ob nur adsorbiert oder vielleicht als Zinkverbindung, muß ich dahingestellt sein lassen, jedenfalls aber ist es in dem gut gewaschenen Niederschlag nachzuweisen. Löst man denselben in verdünnter Salzsäure, filtriert vom Bariumsulfat ab, so gibt das Filtrat direkt oder nach einigem Einengen mit starker Natronlauge und Kupfersulfatlösung Biuretreaktion.

Es wurden nun noch zwei Wege versucht: 1. die Ausfällung mit Natriumcarbonat; 2. die Ausfällung mit H_2S unter zeitweiser Absättigung der freigewordenen Schwefelsäure mit Natriumcarbonat.

Dabei stellte sich nun folgendes heraus: Wenn man zu der Lösung Natriumcarbonat bis zur völligen Ausfällung des

Zinks hinzusetzt, also bis zur alkalischen Reaktion, dann erhitzt, filtriert, mit heißem Wasser nachwäscht, Filtrat und Waschwässer nach Ansäuern mit etwas Schwefelsäure eindampft und den Stickstoff bestimmt, so ergibt sich regelmäßig gegen die direkte Bestimmung ein Minus entsprechend einigen Zehntel Kubikzentimeter $^n/_5$-Säure, was unter Umständen schon einen sehr erheblichen Fehler darstellt. Das Defizit ist geringer, verschwindet auch manchmal, wenn man der alkalischen Mischung wieder etwas Salzsäure bis zur sauren Reaktion hinzusetzt, also einen Teil des basischen Zinkcarbonates wieder in Lösung bringt, erhitzt und nun ebenso verfährt. Die kleinen in Lösung befindlichen Mengen Zink stören bei der Kjeldahlbestimmung nicht.

Besser war das Resultat bei Anwendung des zweiten Verfahrens. Man leitet in die wie angegeben verdünnte Lösung längere Zeit Schwefelwasserstoff ein und stumpft von Zeit zu Zeit die freiwerdende Säure durch Zusatz von Natriumcarbonatlösung ab, jedoch so, daß die Reaktion nur vorübergehend alkalisch wird. Nachdem der größte Teil des Zinks entfernt ist, was man allerdings erst nach einiger Erfahrung zu beurteilen vermag, filtriert man und wäscht gut nach, dampft bei schwach saurer Reaktion etwas ein und verfährt dann wie gewöhnlich. Dabei bleibt etwas Zink in Lösung, diese Quantität stört jedoch nicht. Nach diesem Verfahren erhielt ich selbst in den allerdings nur wenigen Versuchen, die ich angestellt habe, befriedigende Übereinstimmung.

10 ccm Filtrat der Zinksulfatfällung aus einem ziemlich peptonreichen Albumosepeptongemisch erforderten

a) bei direktem Verfahren . . 6,05 ccm $^n/_5$-Säure,
b) nach Fällung mit H_2S . . 6,0 „ „

10 ccm eines anderen Zinkfiltrates

a) 5,0 ccm $^n/_5$-Säure,
b) 4,9 „ „

Indessen kann ich nicht verschweigen, daß andere Untersucher bei der Nachprüfung im Laboratorium größere Differenzen bekamen. Vielleicht wäre es zweckmäßig, dem Zinkfiltrat vor dem Einleiten von H_2S die dem Schwefelsäuregehalt äquivalente Quantität Natriumacetat hinzuzusetzen oder besser noch etwas mehr als diese. Dies soll noch weiter geprüft werden.

5. Über die quantitative Bestimmung des Schwefels im Harn und die Bedeutung des neutralen Schwefels.

Die Methode der Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn ist in neuerer Zeit in verschiedenen Publikationen behandelt worden, die sich bemühen, an die Stelle der alten — wie zugegeben werden muß, recht umständlichen — ursprünglichen Liebigschen Methode neue zu setzen, die weniger Zeit erfordern und an Genauigkeit dasselbe leisten oder annähernd dasselbe. Die Urteile sind nun recht verschieden ausgefallen. Wie ich einem Referat von Glikin im Centralbl. f. Biochemie u. Biophysik 11, 233 entnehme, hat Ssobkewitsch die Methode der Salpeterschmelze — S. bezeichnet sie mit meinem Namen, im Interesse der Kürze mag dies vielleicht gestattet sein, in Wirklichkeit aber ist sie die Liebigsche, nur mit dem Unterschied, daß ich an die Stelle des Kalihydrats aus verschiedenen Gründen Natriumcarbonat gesetzt habe — und die Methoden von Schulz (Greifswald), Konschegg, Mohr, Modrakowski, Abderhalden und Funk[1]) einer vergleichenden Untersuchung unterzogen und ist dabei zu dem Resultat gekommen, daß meine Methode, um mit dem Autor zu sprechen, die genaueste, allerdings auch die langwierigste sei.

Mit diesem Urteil stehen nun andere in Widerspruch, die augenscheinlich auf Mißverständnissen betreffs der Ausführung des Verfahrens beruhen.

Österberg und Wolf[2]) erlauben sich sogar zu sagen: „Es existieren zahlreiche Beispiele ungenauer Untersuchungen über die Schwefelverteilung beim Hund“[3]) (nämlich im Harn) und zitieren dabei: E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 294, 1880.

Ich gehe wohl nicht zu weit, wenn ich ein derartiges beiläufiges „Abtun“ mühevoller und sorgfältiger Untersuchungen als durchaus unangemessen bezeichne: wenn man ein abfälliges Urteil fällt, hat man auch die Pflicht, es zu begründen. An der von Österberg und Wolf zitierten Stelle ist übrigens gar

[1]) Mit den 3 letzten Namen bezeichnet Verf. die von einer ganzen Reihe von Autoren ausgearbeitete Methode, die auf der Verbrennung mit Natriumsuperoxyd beruht; siehe hierüber weiter unten.

[2]) Diese Zeitschr. 5, 311, 1907.

[3]) Im Original nicht gesperrt.

nicht von der Bestimmung des Schwefels im Harn die Rede, im ganzen 4. Bande überhaupt nicht, ich weiß also gar nicht, worauf sich die Autoren beziehen. Vielleicht lag ihrer Ansicht eine alte Äußerung von Gruber[1]) zugrunde, die auf einem Mißverständnis beruht. G. sagt l. c. S. 396:

„Der Schwefelgehalt des verfütterten Fleisches, des Harns und des Kotes wurde durch Verschmelzen mit Kali und Salpeter bestimmt. Zur Bestimmung des Schwefels im Harn wurden täglich 100 oder 50 ccm Harn zur Vermeidung von Verlusten alkalisch gemacht und so zur Analyse aufbewahrt. Das Verfahren war im übrigen das gewöhnliche. E. Salkowski hat angegeben, daß es auch bei Gegenwart von salpetersauren Salzen, von Alkalisalzen und organischer Substanz gelingt, durch fortgesetztes Auswaschen und Behandeln mit Salzsäure den schwefelsauren Baryt völlig zu reinigen. Im Vertrauen auf diese Angabe habe ich anfänglich den geglühten schwefelsauren Baryt nicht mit Salzsäure angezogen, sondern die beim Eindampfen mit Schwefelsäure eintretende Gewichtszunahme zum Gewicht des ersten Glührückstandes hinzuaddiert. Ich mußte dieses Verfahren mit dem Verluste von 22 Analysen büßen, die keine Übereinstimmung zeigten."

Gruber hat mich damals mißverstanden und mir Äußerungen in den Mund gelegt, die ich nie getan habe. Gruber zitiert als Beleg Zeitschr. f. physiol. Chem. 1. Die Seitenzahl ist nicht angegeben. Die einzige Stelle, auf die sich G. beziehen konnte, findet sich auf S. 16. Es heißt daselbst:

„Bezüglich der S-Bestimmung (nämlich im Harn) habe ich meinen früheren wiederholten Bemerkungen nichts hinzuzufügen, außer daß auch dabei der Harn zuerst mit Na_2CO_3 stark alkalisch gemacht und eingedampft wurde. Man beugt auf diesem Wege gleichzeitig einer etwaigen Zersetzung von Sulfocyansäure vor. Der erhaltene schwefelsaure Baryt, der sich durch lange fortgesetztes Waschen und interkurrente Säurebehandlung auf dem Filter völlig von Chloriden befreien läßt, wurde, wie unter 2. erörtert, weiter behandelt."[2])

[1]) Zeitschr. f. Biol. 16, 367.

[2]) Unter 2. habe ich das Verfahren beschrieben, das ich angewendet habe, um den durch Entweichen von Schwefelsäure aus dem Bariumsulfat und die Bildung von Schwefelbarium entstandenen Fehler zu korrigieren.

Hier ist also weder von organischer Substanz, noch von Nitraten die Rede. Selbstverständlich handelt es sich dabei um Salpeterschmelze; das ist nicht erwähnt, geht aber aus dem Zusammenhang hervor.

Die früheren wiederholten Bemerkungen finden sich u. a. in Virchows Arch. 58, 12. Es heißt daselbst:

„Dasselbe (nämlich das Filtrat von der Schmelze des Harns mit Na_2CO_3 und KNO_3) wird vorsichtig mit Salzsäure angesäuert und zur Verjagung der Salpetersäure wiederholt mit Salzsäure zur Trockne gedampft. . . Der Niederschlag (nämlich von schwefelsaurem Baryt) läßt sich, wenn seine Menge nicht zu groß ist, mit heißem Wasser vollständig auswaschen."[1])

Ferner Virchows Arch. 26, 326: „Die Schmelze wird in Wasser gelöst, filtriert und das Filtrat in bekannter Weise durch wiederholtes Abdampfen mit Salzsäure von Salpetersäure befreit."[2])

Meine Angaben beziehen sich also keineswegs, wie Gruber annimmt, auf Lösungen, die salpetersaure Salze und organische Substanzen enthalten, sondern auf solche Schmelzen, die lege artis verarbeitet sind.

Daß es für genaue Bestimmungen durchaus erforderlich ist, die Salpetersäure durch wiederholtes Abdampfen mit Salzsäure möglichst zu entfernen, ist ja allgemein anerkannt.[3])

Man könnte nun mit Recht fragen, warum ich jahrzehntelang zu den Äußerungen Grubers geschwiegen habe und mich jetzt noch gegen dieselben wende. Die Erklärung liegt darin, daß ich das Mißverständnis Grubers für offensichtlich hielt; nachdem aber meine Angaben als Beispiele „ungenauer Untersuchungen" zitiert worden sind, sehe ich mich denn doch genötigt, das Sachverhältnis klarzulegen, um einer Legendenbildung vorzubeugen.

Handelt es sich um Schwefelbestimmungen, bei denen es auf die äußerste Genauigkeit abgesehen ist, so muß die Prüfung

[1]) Die Behandlung mit Salzsäure auf dem Filter habe ich später als überflüssig wieder aufgegeben.

[2]) Richtiger vielleicht: möglichst befreit, denn ganz läßt sich die Salpetersäure schwerlich entfernen.

[3]) Fresenius, Zeitschr. f. analyt. Chem. 16, 339 und G. Lunge, ebenda 19, 419. — Fresenius, Quantitative Analyse, 6. Aufl., S. 152 und 301.

der Salzsäure auf Schwefelsäure mit besonderer Sorgfalt ausgeführt werden. Es genügt dann nicht, einfach eine Probe der Salzsäure nach einiger Verdünnung mit Bariumchlorid versetzt stehen zu lassen, sondern man muß eine größere Quantität abdampfen und den Rückstand untersuchen. Ich pflege bei der Schwefelbestimmung 3mal mit je 100 ccm Salzsäure von 1,124 D abzudampfen und dementsprechend 300 ccm Salzsäure zur Prüfung auf Schwefelsäure auf dem Wasserbad oder besser auf dem Dampfbad zu verdampfen. Mir ist noch keine Salzsäure vorgekommen, die sich, so geprüft, schwefelsäurefrei erwiesen hätte. Ich habe daher stets die Salzsäure selbst noch einmal überdestilliert. Meine sämtlichen in der Literatur vorhandenen S-Bestimmungen sind mit so gereinigter Salzsäure ausgeführt. Ob ich dies erwähnt habe, ist mir nicht erinnerlich, aber sehr wahrscheinlich. Will man sich diese Mühe ersparen, so muß man einen Kontrollversuch mit 300 ccm derselben Salzsäure machen und das erhaltene $BaSO_4$ abziehen.

Übrigens ist die käufliche Salzsäure im Laufe der Zeit erheblich reiner geworden. Aus 300 ccm auf dem Dampfbad eingedampfter Salzsäure erhielt ich kürzlich nur 2,6 mg $BaSO_4$.

Nun gebe ich bereitwillig zu, daß das Bestreben, das Salpeter-Schmelzverfahren durch ein schnelleres zu ersetzen, durchaus berechtigt ist, unter Umständen auch dann, wenn man dabei einen kleinen Fehler in den Kauf nehmen muß. Am meisten angewendet wird wohl die Oxydation mit Natriumsuperoxyd. Das Verfahren hat viele Väter. Ich nenne außer Höhnel-Glaser[1]), Asboth[1]), Düring[2]), Modrakowski[3]), Sadikoff[4]), Neumann-Meinertz[5]), Folin[6]), Funk und Abderhalden[7]). Jeder Autor hat etwas daran geändert. Eines Urteils über dieses Verfahren möchte ich mich enthalten, da ich zu wenig Erfahrungen darüber habe.

---

[1]) Hoppe-Seyler-Thierfelder, 8. Aufl., S. 552.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 281, 1896/97.

[3]) Ebenda, 38, 562, 1903.

[4]) Ebenda, 39, 396, 1903.

[5]) Ebenda, 43, 37, 1904/5.

[6]) Journ. of Biolog. Chem. zitiert nach Thierfelder, 8. Aufl., S. 573.

[7]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 331, 1908/9.

Meine Versuche, die ich vor der Publikation von Abderhalden und Funk, also nicht genau nach dem daselbst angegebenen Verfahren, angestellt habe, haben mich insofern nicht befriedigt, als ich nie eine ganz restlose Verbrennung erzielen konnte, außerdem die mit Salzsäure angesäuerte Lösung stets nach Schwefelwasserstoff roch. Ob bei der nachfolgenden Oxydation mit Bromwasser nicht doch etwas Schwefel verloren gehen könnte, erscheint mir etwas zweifelhaft, allerdings sind die durch Geruch noch wahrnehmbaren Mengen H_2S so gering, daß sie analytisch vielleicht überhaupt nicht ins Gewicht fallen.

Die allerneueste von Wolf und Österberg[1]) sehr gelobte Methode von Benedict anzuwenden, habe ich noch nicht Gelegenheit gehabt.

Schließlich noch ein Wort über die Bedeutung des neutralen Schwefels im Harn.

Österberg und Wolf[2]) sagen, Folin habe aus seinen Untersuchungen den Schluß gezogen, daß der neutrale Schwefel eng mit dem sog. endogenen Stoffwechsel zusammenhänge. Die genannten Autoren schreiben Folin die Einführung der Begriffe „endogener" und „exogener" Stoffwechsel überhaupt zu. Das ist nicht richtig, genau dieselben Bezeichnungen sind schon viel früher von Burian für die Harnsäure gebraucht. Auch für den neutralen Schwefel ist die Unterscheidung gemacht worden, wenn auch nicht mit denselben Worten.

Es ist gleichzeitig von Kast und Mester[3]), sowie von Rudenko[4]) in meinem Laboratorium, etwas später von Sawelieff[5]) gleichfalls unter meiner Leitung nachgewiesen worden, daß die Ausscheidung des neutralen Schwefels im Verhältnis zum Sulfatschwefel bei der mit Zerfall von Protoplasma-Eiweiß einhergehenden Chloroformnarkose außerordentlich ansteigt. Dieses ist später auch von verschiedenen anderen Forschern als Wirkung von Protoplasmagiften überhaupt konstatiert werden. In der Arbeit von Sawelieff ist daraus der

[1]) Diese Zeitschr. 29, 429, 1910.
[2]) Diese Zeitschr. 5, 308 und 334, 1907.
[3]) Zeitschr. f. klin. Med. 18, 469, 1891.
[4]) Virchows Archiv 125, 102, 1891.
[5]) Virchows Archiv 135, 195, 1894.

Schluß gezogen worden, daß das Körpereiweiß bei seinem Zerfall mehr Neutralschwefel liefere als das Nahrungseiweiß. M. Weiß[1]), der sich nach seinen Untersuchungen dieser Anschauung anschließt, berechnet aus den Zahlen von Sawelieff, daß von dem unter dem Einfluß von Chloroform mehr ausgeschiedenen Schwefel nur 19% auf Schwefelsäure entfallen, also 81% auf neutralen Schwefel.[2]) Es ist wohl selbstverständlich, daß ich an der Ableitung der Schlußfolgerungen aus den von Sawelieff in seinen Versuchen erhaltenen Zahlen wesentlich beteiligt bin. Die eigentümliche Stellung des Neutralschwefels ist also von mir und meinen damaligen Schülern erkannt worden, lange ehe Folin diese Ansicht aussprach.

[1]) Diese Zeitschr. 27, 175, 1910.

[2]) l. c., S. 185.

Untersuchungen über Oberflächenspannungsverhältnisse in der Milch und über die Natur der Hüllen der Milchfettkügelchen.

Von

Heinrich Bauer.

(Aus dem Institut für Molkereiwesen und landw. Bakteriologie an der k. k. Hochschule für Bodenkultur in Wien.)

(Eingegangen am 4. April 1911.)

Mit 1 Tafel.

Zu den vorliegenden Untersuchungen wurde ich durch die Arbeit von B. Burri und Ths. Nußbaumer[1]) angeregt. Die genannten Forscher kommen zu dem Resultat, daß gekühlte Milch gegenüber frisch gemolkener eine bedeutend geringere Oberflächenspannung zeigt, daß eine $^1/_2$stündige Kühlung unter 10° C genügt, eine so geringe Oberflächenspannung herzustellen, wie wenn die Milch nach erfolgtem Gefrieren aufgetaut und auf ihre Oberflächenspannung untersucht wird. Diese durch Kühlung verursachte Oberflächenspannungsdepression ist durch Erwärmen bis zu 37° C nicht rückgängig zu machen. Die Autoren sprechen die Vermutung aus, daß die Ursache der Erscheinung im Festwerden des Milchfettes liegt, und bemerken, daß „durch eine Oberflächenspannungsbestimmung vor und nach

---

[1]) Über Oberflächenspannungs- und Viscositätsbestimmungen bei Kuhmilch unter Verwendung des Traubeschen Stalagmometers. Diese Zeitschr. 22, 90, 1909.

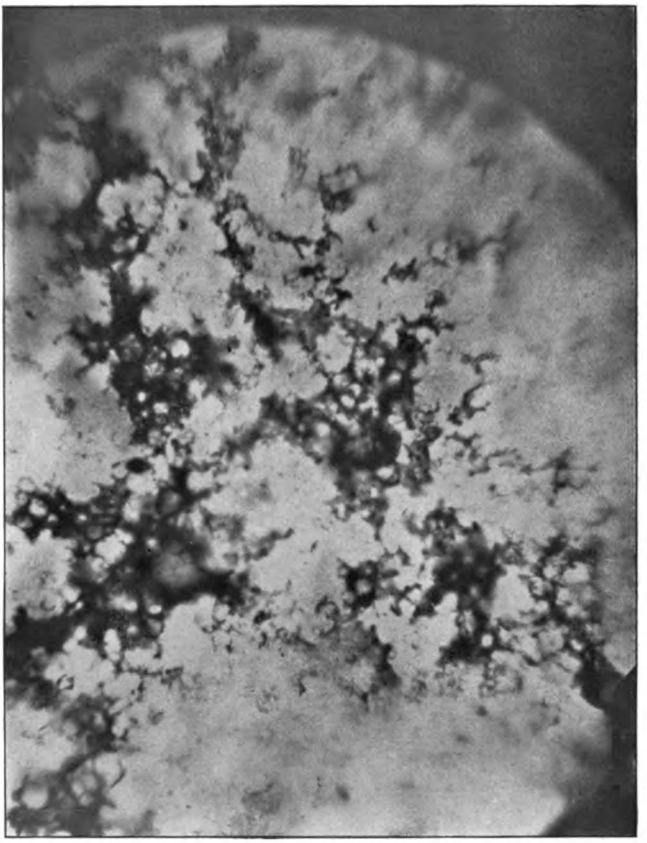


Fig. 1.

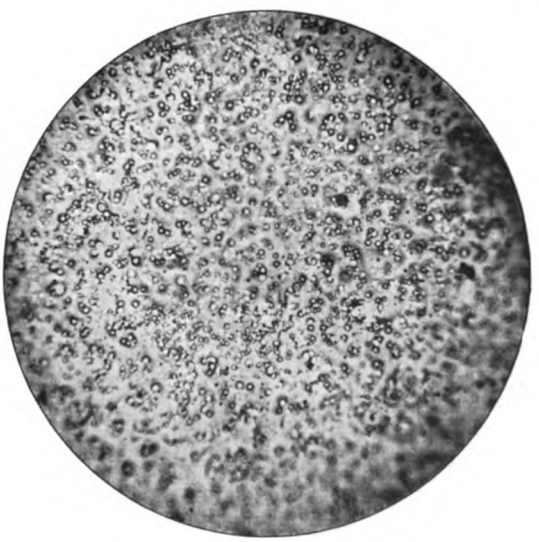


Fig. 2.

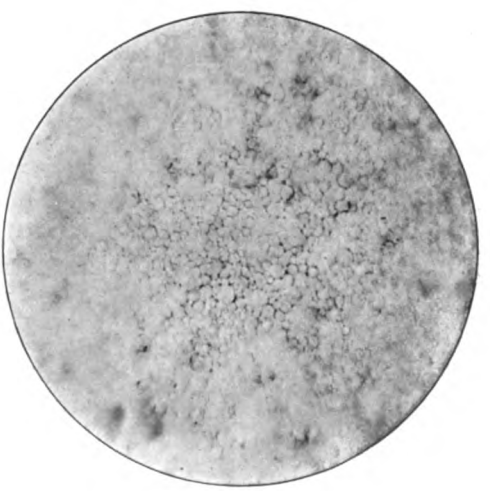


Fig. 3.

der einstündigen Kühlung auf einfache Weise ermittelt werden kann, ob die Milch schon vorher gekühlt war oder nicht. Im ersteren Falle werden die beiden erhaltenen Werte ungefähr zusammenfallen, im letzteren Falle wird eine charakteristische Differenz auftreten".

Ich suchte vor allem experimentell festzustellen, ob die Oberflächenspannungsdepression, die durch die Kühlung hervorgerufen wird, tatsächlich durch Festwerden des Fettes begründet ist, wie Burri und Nußbaumer annehmen. Bei der Anstellung der Versuche ging ich von folgender Überlegung aus: Ist die Vermutung der Autoren richtig, dann muß

1. Erwärmung über den Schmelzpunkt des Fettes die Depression rückgängig machen,

2. muß nicht nur die Oberflächenspannung, sondern auch die Größe der Oberflächenspannungsdepression mit der Konzentration des Fettes in einem Zusammenhang stehen.

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung benützte ich das Traubesche Stalagmometer (bezogen von C. Gerhardt in Bonn), und zwar die Größe II (Tropfenzahl für Wasser 51,05 bei 18° C) für Milch und Magermilch, und Größe III für Rahm (Tropfenzahl für Wasser 39,4). (Die „relative Oberflächenspannung" wird aus der Formel $\frac{Z}{Zw}$ berechnet, wobei Z die Tropfenzahl der zu untersuchenden Flüssigkeit, Zw die Tropfenzahl des Stalagnometers für Wasser bedeutet.) Der Apparat war im Innern eines heizbaren Wärmekastens für Mikroskope nach Pfeiffer angebracht und wurden sämtliche Bestimmungen bei 18° C angestellt. Die angegebenen Zahlen sind Mittel aus Doppelbestimmungen.

1. Zunächst wollte ich feststellen, bei welchen niedrigsten Temperaturen — um Veränderungen in der Milch durch allzu hohe Temperaturen zu vermeiden — die größtmögliche Erhöhung der Oberflächenspannung in einer nach Angaben von Burri und Nußbaumer gekühlten Milch zu erreichen ist. Anfangs versuchte ich es mit Temperaturen unter 50°. Die Milch wurde in 2 dicht verschlossene Kölbchen gefüllt, um Wasserverluste durch Verdunstung zu vermeiden, und nach der Kühlung bzw. Erwärmung auf eine Temperatur von 18° gebracht und untersucht.

Probe	Fettgehalt %	Gekühlt ° C	Gekühlt St.	Erwärmt ° C	Erwärmt St.	Tropfenzahl	Differenz gegen frische Milch
Milch, frisch ungekühlt	3,7					71,7	
Dieselbe, kurz nach dem Melken gekühlt . .		unter 10	1			81,5	9,8
Dieselbe, nach der Kühlung erwärmt . . .				45	$3^1/_2$	76,0	4,3
Magermilch aus frisch gemolkener Milch zentrifugiert	0,5					73,1	
Dieselbe, gekühlt . . .		10	$2^1/_2$			76,8	3,7
Dieselbe, nach der Kühlung erwärmt . . .				47	$3^1/_4$	76,0	2,9

Während Temperaturen bis zu 37° C nach Burri und Nußbaumer die durch Kühlung verursachte Depression der Oberflächenspannung nicht rückgängig machen, bewirken also Temperaturen von 45 und 47° C eine deutliche, wenn auch geringe Erhöhung der Oberflächenspannung und ist die Tropfenzahldifferenz zwischen frischer und nach erfolgter Kühlung erwärmter Milch noch ziemlich groß; deshalb ging ich zu einer Temperatur von 50° über und untersuchte zunächst, wie lange die Erwärmung dauern muß, um bei dieser Temperatur die größtmögliche Erhöhung der Oberflächenspannung gekühlter Milch zu erzielen.

Probe	Fettgehalt %	Tropfenzahl
Mischmilch unter 10° C	3,9	
3h gekühlt		79,2
auf 50° 3h erwärmt		75,1
„ 50° 2h „		75,2
„ 50° $^1/_2$h „		75,8
Mischmilch	4,0	
4h auf 5° gekühlt		79,7
2h „ 50° erwärmt		75,7
$^3/_4$h „ 50° „		75,7

Es reicht also eine $^3/_4$stündige Erwärmung auf 50° hin, um die größtmögliche Oberflächenspannung in einer gekühlten Milch herzustellen. Jetzt ist die Frage, wird durch dieses Erwärmen die Oberflächenspannung erreicht, wie sie vor dem Kühlen bestand, und wenn nicht, wie groß ist die Differenz? Hierüber gibt folgender Versuch Aufschluß:

Probe	Fettgehalt %	Tropfenzahl
Milch kurz nach dem Melken	3,8	72,0
1h auf 8° gekühlt		79,3
3/4h auf 50° erwärmt		73,0

Durch Erwärmen in der angegebenen Weise wird also die ursprüngliche Oberflächenspannung nahezu erreicht. Diesen Umstand habe ich bei einem später zu besprechenden Versuch benutzt, um die ursprüngliche Oberflächenspannung ungefähr zu bestimmen.

2. Bezüglich der Abhängigkeit der Oberflächenspannung im Allgemeinen von der Konzentration der die Oberflächenspannung herabsetzenden Körper, ist es aus verschiedenen Untersuchungen bekannt, daß die Oberflächenspannungsverminderung der Konzentration dieser Körper nicht direkt proportional ist.

Neuere Untersuchungen haben ergeben, „daß sich viele Stoffe leicht an der Oberfläche ansammeln und dort konzentriert werden, so daß bereits geringe Quantitäten genügen, um die Oberflächenspannung herunterzusetzen, und daß Steigerung der Konzentration relativ wenig wirksam ist".[1]) Ebenso verhält es sich mit der durch Kühlung in der Milch verursachten Depression. Ebenso wie die durch die oberflächenaktiven gelösten Stoffe verursachte Depression dem Gehalt an diesen nicht direkt proportional ist, ist auch die durch Kühlung bedingte Depression in der Milch dem Fettgehalt nicht direkt proportional. Dies geht aus folgenden Versuchen hervor:

Probe	Fettgehalt %	Tropfenzahl
Vollmilch, kurz nach dem Melken . .	3,8	74,1
Dieselbe, 2h auf 3° C gekühlt		77,5
Magermilch aus obiger Milch	0,15	
Frisch zentrifugiert		72,3
Dieselbe, 6h auf 3° gekühlt		73,1

Während die Vollmilch durch die Kühlung eine erhebliche Oberflächenspannungsdepression erfahren hat, tritt bei der Mager-

[1]) B. Kobler, „Untersuchungen über die Viscosität und Oberflächenspannung der Milch". Arch. f. d. ges. Physiol. 125, 1.

milch nur eine Differenz von 0,8 Tropfen zwischen frischer und gekühlter Magermilch auf. Durch Zentrifugieren aus frisch gemolkener Milch erhielt ich eine Magermilch mit 0,5% Fettgehalt. In frischem Zustande ergab sie eine Tropfenzahl von 73,1 nach $2^1/_2$stündiger Kühlung unter 10° 76,8 Tropfen, also eine Depression von 3,7 Tropfen. Das stimmt also vollständig mit dem angeführten Satz überein: bereits geringe Mengen genügen, um eine erhebliche Depression zu verursachen. Daß Steigerung der Konzentration relativ wenig wirksam ist, dürfte aus der nächsten Tabelle hervorgehen, obwohl die anzuführenden Zahlen teilweise nur Annäherungswerte darstellen, da die minimalen Tropfenzahlen, d. h. die größte Oberflächenspannung, auf Grund der vorhergehenden Versuche durch Erwärmen ermittelt ist. Nichtsdestoweniger ist aus den folgenden Zahlen ersichtlich, daß von einem gewissen Fettgehalt an weder die Oberflächenspannung wesentlich abnimmt, noch die Depression durch Kühlung viel größer wird.

Probe	Fett %	Tropfenzahl		Differenz (annähernd die Depression)
		erwärmt $^3/_4{}^h$ auf 50° C	gekühlt 1^h unter 10° C	
Rahm	11	55,7	57,2	1,5
„	14,4	55,9	58,0	2,1
„	30,9	59,2	61,6	2,4

Milch, eine Emulsion von Fett, zeigt also bezüglich der Oberflächenspannung ein ähnliches Verhalten wie Lösungen, was die Abhängigkeit von der Konzentration anbelangt.[1])

[1]) Interessant ist es, daß sich auch anderweitig Analogien zwischen Lösungen und Emulsionen bezüglich der Oberflächenspannung ergeben haben. Nach Schluß dieser Untersuchungen wurde ich von Herrn Prof. Dr. Winkler auf eine Arbeit von F. Czapek*) über die Oberflächenspannung der Plasmahaut aufmerksam gemacht. Er kam schon in einer früheren Arbeit zu dem Ergebnis, „daß sehr zahlreiche wasserlösliche Stoffe, die die Eigenschaft haben, die Oberflächenspannung des Wassers stark herabzusetzen, die Exosmose von Zellinhaltsstoffen durch die Plasmahaut allemal dann hervorzurufen beginnen, wenn die Oberflächentension

*) F. Czapek, Über die Oberflächenspannung und den Lipoidgehalt der Plasmahaut in lebenden Pflanzenzellen. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 28, Heft 9, 1910.

Die zu Anfang der Arbeit gemachten Voraussetzungen treffen also zu. Die Depression zeigt eine Abhängigkeit von der Konzentration des Fettes und ist durch Erwärmen fast vollständig rückgängig zu machen. Wir können daher behaupten, daß der größte Teil des Milchfettes nach einer 1stündigen Kühlung der Milch unter 10^0 in den festen Zustand übergeht und dieser Umstand die Oberflächenspannungsdepression verursacht. Dabei möchte ich bemerken, daß diese Untersuchungen gleichzeitig eine Bestätigung der bereits angeführten Ansicht von Burri und Nußbaumer sein dürften, daß das Stalagmometer ein für molkereitechnische Zwecke gut geeignetes Instrument ist, und die bereits erfolgte Kühlung einer Milch durch dasselbe leicht und sicher konstatiert werden kann.

Da die Kenntnis des Aggregatzustandes des Milchfettes für die Theorie des Butterungsprozesses von Bedeutung

---

der Lösung etwa den Grenzwert 0,68, bezogen auf die Tension des Wassers, gleich 1 erreicht hat".

Im weiteren Verlauf des Berichtes sagt der Verfasser: „In der Tat besteht nach dem Ausfall der Versuche mit Tributyrin, Natriumoleat, Triolein, vielen natürlichen Pflanzen- und Tierfetten sowie mit Lecithin- und Cholesterinemulsionen kein Zweifel darüber, daß die physiologische Wirkung solcher Emulsionen die gleiche ist, wie die äquicapillarer echter Lösungen. Überall hat sich außerdem ergeben, daß die Wirkung solcher Emulsionen auf die diosmotischen Eigenschaften der Plasmahaut bei einer relativen Tension von 0,69, auf Wasser bezogen, auftritt ... Hingegen stellte es sich heraus, daß Neutralfette ganz allgemein die Tension des Wassers, selbst wenn ihre Emulsion noch so konzentriert ist, nicht weiter herabzudrücken vermögen, als bis etwa zu dem relativen Werte 0,69."

Sowohl bei den Versuchen von Burri-Nußbaumer als auch bei meinen Versuchen haben sich bereits in gewöhnlicher Vollmilch niedrigere Werte ergeben, jedoch erst nach dem Kühlen.

Die durchschnittliche Tension bei Burri und Nußbaumer ist
in frisch gemolkener Milch 0,72
in gekühlter Milch 0,67

Die durchschnittliche Tension bei meinen Versuchen ist
in frisch gemolkener Milch 0,69
in gekühlter Milch 0,64

(Die Depression ist also fast gleich groß.)

Das darf jedoch nicht wundernehmen, selbst wenn Czapek Emulsionen fester Fette untersucht hätte, da die Milch außer Fett noch viele stark oberflächenaktive Stoffe enthält.

ist, versuchte ich nun denselben durch Anwendung von Fettfarbstoffen mikroskopisch zu konstatieren. Zunächst versuchte ich es mit einer alkoholischen Lösung von Sudan III, später mit Osmiumsäure und Indophenol. Ich ging von der durch Handwerck und Starke gemachten Beobachtung aus, daß Osmiumsäure nur flüssiges Fett färbt, festes hingegen nicht. Indem ich Sudan III und Indophenol anwendete, dachte ich daran, daß das flüssige Fett sich rascher färben werde als das feste. Das angestrebte Ziel konnte ich durch diese Färbungen jedoch nicht erreichen. Es ergab sich kein Unterschied in bezug auf die Raschheit der Färbung bei tief gekühlter oder frisch gemolkener Milch bei Anwendung von Sudan III oder Indophenol. Osmiumsäure hingegen ergab sehr schwankende Färbungen, manchmal blieb frische Milch ungefärbt, wogegen sich selbst tief gekühlte Milch in kurzer Zeit grünlichgelb färbte. Eine andere Erscheinung jedoch, die ich bei Anwendung von Sudan III und später noch deutlicher bei Indophenol wahrgenommen habe, führte mich zur Untersuchung der Hüllen der Milchfettkügelchen. Färbt man mit Sudan III einen Tropfen frisch gemolkener Milch, so sieht man einen ziemlich großen Teil der Fettkügelchen gefärbt, einen anderen vollständig farblos. Dieselbe Beobachtung kann man an abgestandener Milch machen, die in der Eprouvette auf 60 bis 70° erwärmt wurde. Bei Erwärmen auf nur 45° C färben sich nur einzelne Fettkügelchen nicht. 3 bis 5 Stunden nach dem Melken färben sich ausnahmslos alle Fettkügelchen. Die farblosen Fettkügelchen färben mehr oder weniger rasch nach. Bei manchen Proben kann man eine Färbung aller Fettkügelchen beobachten, wenn man das Präparat nicht rasch genug unter das Mikroskop bringt. Weit geeigneter für diese Untersuchungen ist das Indophenol (konzentrierte Lösung in 70%igen Alkohol). Bei Anwendung dieses Farbstoffes widerstehen die Fettkügelchen, die anfangs ungefärbt erscheinen, viel hartnäckiger der Färbung als bei Sudan III. Die Färbung erfolgt in dieser verschiedenen Art ganz ohne Rücksicht auf die Größe der Fettkügelchen. Wahrscheinlich beruht sie auf einer Verschiedenheit der die Fettkügelchen umgebenden Hüllen. Daß die Hüllen dabei eine wesentliche Rolle spielen, ersehen wir daraus, daß die Erscheinung in homogenisierter Milch nicht auftritt.

Ich kann an dieser Stelle nicht die ganze umfangreiche Literatur über die Hüllenfrage anführen, und verweise diesbezüglich auf die Zusammenfassung derselben in Sommerfelds, Handb. d. Milchkunde, 7, 135 und entnehme derselben nur das Wesentlichste.

Während Bouchardet und Quevenne meinen, die Hüllen beständen aus einer Caseinlösung, verneinen Kehrer, Fraas und Soxhlet die Existenz einer besonderen Eiweißmembran. Danilewsky und Radenhausen isolierten die Hüllen auf eine allerdings nicht einwandfreie Weise und hielten das die Fettkügelchen umgebende Eiweiß nicht für ein Bläschen, sondern für eine Art Stroma.

Storch suchte auf andere Weise die Milchkügelchen zu isolieren, nämlich durch 4 bis 5maliges Waschen mit Wasser. Nach seinen Untersuchungen ist die Hülle der Milchkügelchen weder Casein noch Laktalbumin, sondern von einer besonderen mucinartigen Substanz. Außerdem gelang Storch die Färbung der Milchkügelchen mit wässerigen Lösungen von Pikrokarmin und Nigrosin. Auf Anregung von C. Lehmann hat neuerdings W. Völtz weitere Untersuchungen angestellt.

Durch eine besondere Versuchsanordnung, indem er frische Kuhmilch unter Wasser schichtete und die aufsteigenden Fettkügelchen auf ihrem Wege durch eine 50 cm hohe Wassersäule sich vom anhafteten Milchplasma reinigen ließ, isolierte er auf vollkommene Weise die Milchkügelchen, filtrierte sie mit Alkohol, zog das Fett durch Äther aus und erhielt so die Hüllen der Milchkügelchen als weiße oder gelblichweiße Blättchen, an denen die Kugelform mikroskopisch noch zu erkennen war. Als Resultat seiner Untersuchungen gibt Völtz an, daß die Fettkügelchen der Milch Hüllen besitzen, wahrscheinlich feste Membranen. Diese Hüllen bestehen aus stickstoffhaltigen, sowie stickstofffreien und unorganischen (besonders Kalksubstanzen), doch ist das Verhältnis dieser Stoffe zueinander außerordentlichen Schwankungen unterworfen, nicht nur bei den Hüllen von Fettkügelchen verschiedener Milch, sondern auch bei den Hüllen der verschiedenen Fettkügelchen derselben Milch. Die Hüllen sind sehr labile, sich vielfach verändernde Gebilde.

Bonnema hält die Untersuchungen Storchs und Popp diejenigen von Völtz nicht für beweisend für die Existenz fester Hüllen. Nachdem Quincke für die Emulsionsbildung eine physikalische Erklärung gab, wurde auch für die Milch allgemein angenommen, daß die Milchkügelchen von einer Schicht Caseinlösung umgeben seien, die dort durch Molekularattraktion festgehalten wird. Dagegen führt Winkler[1]) an, daß man durch einfache mikroskopische Beobachtungen sehr leicht die Anschauung gewinnt, daß tatsächlich feste Hüllen der Fettkügelchen in der Milch vorhanden sind. „Man kann sehr deutlich sehen, daß beim Quetschen der Fettkügelchen unter dem Deckglase der Inhalt der

[1]) Die Milchbildung und die mikroskopische Milchprüfung. Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Österreich, 1906.

Kügelchen in Form eines klaren Tropfens austritt und hierbei eine etwas gefaltete Haut zurückbleibt. In der Milch emulgiertes Fett verhält sich ganz anders, bildet glänzende Tröpfchen, während die Milchfettkügelchen gewöhnlich ein etwas matteres Aussehen besitzen. An größeren und derberen Fettkügelchen ist eine oft gerunzelte Haut ohne weiteres zu beobachten und in manchen Fällen zeigt die Hülle einzelne Lücken, oft eine mehr netzartige Struktur und zuzeiten kann man auch wahrnehmen, daß der Balg der Fettkügelchen vom Inhalt nicht ganz ausgefüllt wird." Ferner spricht er die Vermutung aus, daß die Hüllen teilweise aus Fett bestehen.

Auf die Ansichten von Bonnema und Popp werde ich noch zurückkommen müssen.

Aber auch nach dem bisher Gesagten dürfte es erklärlich erscheinen, daß ich in dieser Frage eine weitere Untersuchung für notwendig erachtet habe, um so mehr, als Hammarsten in seiner „Physiologischen Chemie" (1910) Winklers Ansichten — die mir am ehesten den Beweis für die feste Beschaffenheit der Hüllen zu erbringen erscheinen — nicht berücksichtigt und die Hüllenfrage als nicht geklärt bezeichnet.

Ich versuchte zunächst die Fettkügelchen als solche mit Schleim und Eiweißfarbstoffen zu färben. Ich färbte mit einer konzentrierten Lösung von Bismarckbraun in absolutem Alkohol, wobei ich Trockenpräparate nach Ehrlich machte.[1])

Man kann an den Fettkügelchen selbst keine unterschiedliche Färbung beobachten. Nach ungefähr 10 Minuten jedoch hatten die Fettkügelchen ein ganz verändertes Aussehen, sie waren nicht mehr lichtbrechend und erschienen nur mehr als ganz schwach braun gefärbte Ringe, die nur bei ganz scharfer Einstellung des Mikroskopes sichtbar waren und bei der geringsten Drehung der Mikrometerschraube verschwanden. Es sind dies die durch den Alkohol freigelegten Hüllen. Der Alkohol hatte das Fett extrahiert. In dieser Weise hat auch schon Winkler die Hüllen sichtbar gemacht und Völtz durch Extraktion mit Äther. Die zurückbleibenden Hüllen lassen sich weder durch Indophenol noch durch Sudan färben. Bei den folgenden Versuchen verwendete ich als Lösungsmittel Amylalkohol, der das Fett fast momentan auflöst. Die Hüllen färben sich schwach im wässerigen Methylenblau, besser mit alkalischem Methylenblau oder Eosin, mit Ziehlscher Lösung dagegen außerordentlich intensiv, jedoch zeigt sich um die Hüllen herum eine nach innen zu immer dunkler werdende Lösung des Farbstoffes, so daß die Konturen nicht sehr scharf sind. Weit bessere Färbung erhält man mit einem Gemisch von einem Teil Ziehlscher Lösung, 1 Teil alkalischem Methylenblau und 5 bis 6 Teilen Wassers (die Mischung ist nicht halt-

[1]) Ehrlich, Krause, Mone, Rosin und Weigert, „Enzyklop. der mikroskop. Technik mit besond. Berücksichtigung der Färbelehre". Wien und Berlin 1903.

bar). Das Bild ist besonders in den violett gefärbten Partien klar (man bekommt nämlich Übergänge zwischen rot und blau). Ein so gefärbtes Präparat ist Taf. II, Fig. 2. Kuhwarme Milch mit dem vorher angegebenen Gemisch gefärbt, ohne das Fett mit Amylalkohol zu extrahieren, zeigt einen Teil der Fettkügelchen sehr intensiv gefärbt. Andere erscheinen in den verschiedensten Nuancen, manche fast farblos, wobei die Größe der Fettkügelchen keine Rolle spielt. Dies kann von der verschiedenen Dicke der Hülle bei den einzelnen Fettkügelchen herrühren oder kann auch, wie Völtz[1]) meint, auf verschiedener Zusammensetzung derselben beruhen.

Eine Rahmprobe, die deutlich sauer war, ohne aber geronnen zu sein, zeigte eine auffällige Erscheinung bei der Färbung und nachherigem Zusatz von Amylalkohol. Dort, wo ich den Amylalkoholtropfen von der Seite zusetzte und die Strömung stärker war, zeigte der Farbstoff die Form von Adern, die sich zu einigen größeren vereinigten; die einzelnen kleineren nahmen aber ihren Ursprung von den Hüllen aus, die erhalten blieben. Eine ähnliche Erscheinung konnte ich bei einer Probe von homogenisierter Milch wahrnehmen; das gefärbte Material ordnete sich in Adern an, nur lassen sich hier Hüllen nur vereinzelt wahrnehmen, da sie beim Homogenisieren zerstört wurden. Die im sauren Rahm gesehene Adernbildung läßt auf eine Auflösung, die sich in den Hüllen abspielt, schließen. Ich konnte die Erscheinung in dieser auffälligen Form zwar nicht mehr beobachten, wohl aber sah ich andere Formen von Auflösung bei einer jeden sauren Milchprobe, die ich auf diese Weise untersuchte. Das Mikrophotogramm eines geronnenen Rahmes ist Taf. II, Fig. 1. Man sieht einzelne Hüllen teilweise korrodiert, andere ganz aufgelöst, dazwischen kleinere Teile von zerstörten Hüllen. An manchen Stellen des Präparates sieht man überhaupt nur eine Menge solcher Hüllenteilchen, die nicht mehr erkennen lassen, daß sie einmal zusammenhängende Gebilde dargestellt haben.

Die Hüllen sind als solche in der sauren Milch noch nicht aufgelöst, sie haben nur eine chemische Veränderung erfahren; das geht aus folgendem Versuch hervor:

Wenn man nur Amylalkohol zusetzt, so erscheinen sie erhalten, färbt man nur mit alkalischem oder wässerigem Methylenblau, so werden sie nicht zerstört; es erscheinen nur manche auffallend dünn. Färbt man dagegen mit Carbolfuchsin, so tritt die in Taf. II, Fig. 1 dargestellte Zerstörung ein, die durch die chemische Veränderung, die die Hüllen während des Säuerungsvorganges erfahren haben, erst ermöglicht wird.

Bei dieser chemischen Veränderung spielt die Milchsäure eine wesentliche, wenn auch vielleicht nicht allein ausschlaggebende Rolle. Es zeigen nämlich die Hüllen einer künstlich angesäuerten Milch ganz andere Auflösungserscheinungen als die oben beschriebenen. Setzte ich einer süßen Milch bei Zimmer-

[1]) „Untersuchungen über die Hüllen der Milchkügelchen". Arch. f. d. ges. Physiol. 1904, 102.

temperatur so viel chemisch reine Milchsäure zu, bis sie geronnen war, so daß die Milch 32° SH hatte, so erschienen die Hüllen im Objektglastrockenpräparat nach der Extraktion mit Amylalkohol unverändert, setzte ich aber unter dem Mikroskop an die Seite des Deckglases 1 Tropfen des früher erwähnten Gemisches zu, so verschwanden die Hüllen, noch bevor sie von der Farbflüssigkeit erreicht wurden; man sieht im ungefärbten Teile des Präparates unveränderte Hüllen, näher zur Grenze des gefärbten Teiles erscheinen die Hüllen aufgequollen und unscharf begrenzt, um allmählich ganz zu verschwinden. Im gefärbten Teile des Präparates sind keine Hüllenteilchen zu sehen. Alles ist aufgelöst. Versetzt man die süße Milch mit wenig Milchsäure, so daß sie auf 15° SH kommt, so zeigen die Hüllen im sofort bereiteten Trockenpräparat keine Veränderung in ihrem Verhalten den verschiedenen Farbstoffen gegenüber. Nach 20stündigem Stehen zeigte sich jedoch die oben beschriebene Erscheinung, ohne daß der Säuregrad zugenommen hätte.

Ich untersuchte die stark angesäuerte Probe nach 21stündigem Stehen; nach Extraktion mit Amylalkohol sah ich, daß die Hüllen aufgequollen waren und durch alkalisches Methylenblau allein schon aufgelöst wurden. Zerstörte Hüllen oder Teile derselben, wie bei natürlich gesäuerter Milch, sieht man hier auch nicht. Färbt man mit wässerigem Methylenblau und setzt von der Seite dann Amylalkohol zu, so bleiben die Hüllen erhalten, sind jedoch sehr undeutlich in den Konturen und ungefärbt. Die chemische Veränderung, die die Hüllen bei der natürlichen Säuerung erleiden, scheint demnach etwas anders geartet zu sein als bei Zusatz von Milchsäure, indem im letzteren Fall die Hüllen weit weniger widerstandsfähig gegen die angewendeten Farbstoffe sind. Während bei natürlich gesäuerter Milch die Hüllen durch Carbolfuchsin nur zerstört werden, werden sie bei künstlich angesäuerter Milch vollkommen aufgelöst. Ob diesen Unterschied die langsame Zunahme der Milchsäure bei der natürlichen Säuerung verursacht, oder ob die Lebenstätigkeit der Bakterien dabei eine Rolle spielt, müßte noch untersucht werden. Die Hüllen in saurer Milch sind jedoch auch gegen anderweitige Einwirkungen weniger widerstandsfähig, nicht nur gegen chemische Einflüsse. Dies beobachtete ich bei Untersuchung von Butterproben, die in verschiedener Weise bereitet waren. Ich isolierte die Hüllen in der Weise, daß ich in ein kleines Filter etwa 5 g Butter brachte, das ich in eine zu $^2/_3$ mit Benzol gefüllte Eprouvette gesteckt hatte. Das Filter schob ich nun so weit in das Benzol, daß das Butterklümpchen vollständig eintauchte. Die Fettlösung sinkt nun zu Boden, da das Benzol spezifisch leichter ist, und am Filter bleiben das Casein und die Hüllen zurück. Nach 1 bis 2 Stunden Stehen ist im Filter ein gelblich-weißer Bodensatz zu

sehen, der sich durch Schütteln in die darüber stehende Flüssigkeit aufwirbeln läßt. Nimmt man von diesem Bodensatz etwas unters Mikroskop, so sieht man bei Färbung mit Indophenol, daß er noch etwas Fett enthält. Ich brachte deshalb von jeder Probe eine Platinöse voll in 1 Tropfen Amylalkohol und konnte dann die Hüllen sehr gut beobachten. Man sieht bei süßer, pasteurisierter Butter die Hüllen auch ohne Färbung sehr gut erhalten; einige sieht man vereinzelt, die meisten bilden ein Maschenwerk. Bei pasteurisierter Sauerrahmbutter dagegen sind die Hüllen fast vollkommen zerstört; ganz vereinzelt sieht man noch Hüllen, die erhalten bleiben. Deutlicher kann man dies nach Färbung mit wässerigem Methylenblau sehen; die Hüllen sind zu kleinen Körnchen zertrümmert worden. Bei nicht pasteurisierter Sauerrahmbutter sind die Hüllen zum großen Teil erhalten, insbesondere, wenn der Rahm zu wenig gesäuert war; das Bild unterscheidet sich jedoch deutlich von demjenigen bei Süßrahmbutter, da man keine vereinzelten Hüllen sieht, dagegen kann man an manchen Teilen des Präparates die Hüllen genau so zertrümmert sehen wie bei den pasteurisierten Proben, was bei Süßrahmbutter nicht zu beobachten ist. Während also in pasteurisierter Süßrahmbutter die Hüllen erhalten bleiben, werden sie in pasteurisierter Sauerrahmbutter fast vollständig, in nicht pasteurisierter dagegen nur zum Teil zerstört.

Ähnliche Zerstörung durch Carbolfuchsin wie bei saurer Milch konnte ich bei einigen Proben ranziger Milch beobachten. Ranzige oder „rässe" Milch ist nach Untersuchungen von Winkler ein Milchfehler, „der immer mit einem Rückgange des Milchertrages verbunden und sehr deutlich charakterisiert ist durch das Auftreten stark deformierter und wie zernagt aussehender Fettkügelchen. Er muß somit schon im Euter entstehen". Eine ganz auffällige Zerstörung der Hüllen tritt in der Milch von maul- und klauenseuchekranken Tieren auf. Einige wenige Hüllen bleiben erhalten, während sich die übrigen zu größeren, unregelmäßig geformten Fetzen zusammenballen. Man findet auch Klumpen von durch anhaftende Zellreste zusammengeklebten Fettkügelchen, die sich mit Fuchsin intensiv rot färben. Das Bild ist sehr charakteristisch und war bei allen 5 Proben, die ich untersuchte, zu beobachten. Unter diesen war auch eine Durchschnittsprobe von 5 Kühen, die die Seuche schon überstanden hatten und als gesund erklärt worden waren. Ferner untersuchte ich in derselben Weise 4 Milchproben von maul- und klauenseuchekranken Kühen, die erst seit 2 Tagen krank waren. Es trat die Fetzenbildung, die ich bei den ersten 5 Proben beobachtete, nur bei 1 Probe auf, die anderen enthielten Hüllenteile in der Form kurzer, dicker Fäden. Färbte man zuerst und setzte dann Alkohol zu, so gaben alle 4 Proben ein ganz normales Bild. Zu Beginn der Krankheit sind die Hüllen demnach weit weniger empfindlich gegen die Einwirkung des Carbolfuchsins als in späteren Stadien und nach überstandener Krankheit. Wie lange die Zerstörbarkeit der Hüllen im letzteren Falle anhält, konnte ich nicht konstatieren, ich kann nur die Tatsache anführen, daß eine Mischmilch aus einem vor 2 Monaten durchseuchten Stall noch eine sehr weitgehende Zerstörung zeigte.

Diese Untersuchungen sind jedoch nicht geeignet eine Antwort auf die Frage zu geben, ob die Milchfettkügelchen von einer festen Membrane umgeben sind oder von einer durch Molekularattraktion festgehaltenen Flüssigkeitsschicht. Diese Frage ist es nämlich, um die es sich im wesentlichen handelt. Bonnema[1]) berechnet, daß viele Magermilchteilchen noch innerhalb der Molekularattraktionssphäre des Fettes liegen. Will man die Fettkügelchen isolieren, dann bleibt eine Schicht Magermilch um jedes Fettkügelchen. Da der gequollene Käsestoff selbst klebrig ist, so kann diese Schicht ziemlich dick werden. In der Milch besteht jedoch eine solche Schicht nicht. Diese Hüllen entstehen erst bei der Behandlung mit Äther durch Wasserentziehung. Ähnlich argumentiert Popp[2]). Völtz trocknet nämlich die vom Milchserum befreiten Fettkügelchen auf Deckgläschen über Schwefelsäure, entfettet mit Äther, färbt dann mit alkalischem oder wässerigem Methylviolett, oder Fuchsin.

„Natürlich" sagt Popp, „wenn man die Milchkügelchen vorerst trocknet, wird man unter dem Mikroskop feste Hüllen bemerken. Daß tatsächlich eine Trocknung erfolgt ist, ersieht man aus folgender Beschreibung, die Völtz gibt: ‚Die Hüllen sind häufig nicht homogen, bisweilen erscheinen sie in feinste Fältchen gelegt oder man kann dünnere und stärker verdickte Stellen an ihnen wahrnehmen, so daß die Fettkügelchen in ein Maschenwerk eingebettet erscheinen.' Allerdings will Völtz ähnliche Bilder auch erhalten haben, wenn er die Milchkügelchen vor der Färbung nicht erst trocknet." Eine gerunzelte Oberfläche kann man auch an nicht getrockneten Milchkügelchen in der Milch sehen, diese Beschreibung von Völtz ließe daher nicht auf eine Eintrocknung schließen. Die Bedenken, die Bonnema und Popp äußern, sind jedoch durchaus gerechtfertigt, denn wenn die Fettkügelchen von einer durch Molekularattraktion festgehaltenen Serumschicht umgeben sind, so könnte diese Flüssigkeitsschicht durch Eintrocknen oder durch Wasser entziehende Mittel, wie z. B. Alkohol, oder durch Behandlung mit Äther im Soxhletapparat wirklich fest werden. Meiner Ansicht nach zeigt jedoch der folgende Versuch, daß es doch feste Membranen sind, was Völtz und Storch mit den Fettkügelchen isoliert haben. Ich emulgierte bei 70° C geschmolzenes Tripalmitin in Magermilch. Nach 5stündigem Stehen sieht man bereits Hüllen um die Fetttröpfchen, die etwas dicker sind als diejenigen, die sich in einer Milchprobe gebildet haben, in der ich gleichzeitig mit der ersteren bei 50° geschmolzenes und im Trockenschrank warm filtriertes Butterfett emulgierte. Nach weiteren 36 Stunden sind die Hüllen beim Tripalmitin außerordentlich dick geworden, wie ich es bei keiner der später gemachten Emulsionen beobachten konnte. Sie haben sehr scharfe Umrisse und lassen ganz deut-

[1]) „Haben die Milchfettkügelchen Eiweißhüllen?" (Pharmazeutisch Weekblaad 1904, Nr. 39), Referat im Milchw. Centralbl. 1905, 26.

[2]) M. Popp, Milchzeitung 1904, 515. „Kritisches Referat" über die Arbeit von W. Völtz.

lich eine äußere Kontur erkennen und sind auch ohne Färbung sichtbar. Dies weist unzweideutig darauf hin, daß sich um die Tripalmitintröpfchen herum feste Hüllen bilden, denn wäre es nur eine durch Molekularattraktion festgehaltene Flüssigkeitsschicht, so würde diese keine äußere Kontur aufweisen können. Ein weiterer Versuch, der hierfür spricht, ist folgender: Wenn ich Paraffinum liquidum in Magermilch emulgierte, ließen sich bei genau derselben Behandlung (Trockenpräparat und Amylalkohol) selbst nach 15stündigem Stehen keine Hüllen bemerken. Die Tropfen lösen sich restlos auf. Wenn es also die Molekularattraktion wäre, die an den Fettkügelchen eine flüssige Milchserumschicht festhält, so hätte die Austrocknung und die Wasserentziehung durch den Amylalkohol ebenso wirken müssen wie bei der Milch, bei der Tripalmitin- oder Butterfettemulsion. Ferner bleiben die Hüllen in der Butter erhalten, wie Winkler bei Beobachtung in reinem oder gefärbtem Glycerin wahrgenommen hat, und die ich aus pasteurisierter Süßrahm- sowie nicht pasteurisierter Sauerrahmbutter mittels Benzol isoliert habe. Das deutet ebenfalls auf die feste Beschaffenheit der Hüllen hin. — Demnach erscheint es mir unzweifelhaft, daß die Fettkügelchen von festen Membranen umgeben sind. Es ist kein Grund anzunehmen, daß diese Hüllen sich um das Milchfett nicht auch bilden sollten, sie sind nur nicht sichtbar wie bei der Tripalmitinemulsion, weil sie zu dünn sind.

Nach diesen Untersuchungen kann man wohl behaupten, daß das, was Storch und Völtz analysiert haben, wirklich die festen Hüllen der Milchfettkügelchen waren. Völtz bemängelt mit Recht die Art und Weise, wie Storch die Hüllen isoliert, da die Hüllen durch das Zentrifugieren und durch das Aufsteigen in Rohrzuckerlösungen in ihrer Zusammensetzung verändert werden. Dagegen bestätigt er die Beobachtung Storchs, daß die von ihm isolierte Substanz zu den Mucinkörpern gehört, daß sie bei längerem Kochen mit starker Salzsäure eine reduzierende Substanz abspaltet. Daraus geht jedoch nur hervor, daß die isolierte Substanz einen Mucinkörper enthält, nicht aber, daß sie aus Mucin besteht. Ich habe ein Trockenpräparat von süßer Milch mit Alkohol gehärtet und dann durch 12 Stunden mit Mucincarmin von P. Mayer gefärbt (bezogen von Grübler & Co., Leipzig) und die Hüllen mit Amylalkohol freigelegt. Die Hüllen sind ganz gut gefärbt (Taf. II, Fig. 3), es färbt sich aber das ausgeschiedene Casein ebenso. Die Färbung beruht nämlich bei den Schleimfarbstoffen höchstwahrscheinlich auf dem Kalkgehalt der Schleimstoffe[1]). Die Hüllen

[1]) Enzykl. d. mikr. Technik, I. Aufl., S. 1202 u. 1208.

enthalten ja nach Völtz viel Kalk, und da das Casein auch Kalk enthält, färbt es sich ebenfalls.

Ebenso verhalten sich metachromatische Schleimfarbstoffe wie Thionin oder Toluidinblau. Mit 5%igem Sublimat fixierte Trockenpräparate zeigten sowohl mit Thionin als mit Toluidinblau das Casein und die Hüllen rot-violett gefärbt, während das in wenigen kleineren Flocken ausgeschiedene Albumin intensiv blau erschien.

Mit Amylalkohol freigelegte Hüllen geben dagegen nicht die in der Enzyklop. d. mikroskop. Technik S. 1197 beschriebene Essigsäurereaktion, bei der die meisten Schleimstoffe selbst mit sehr stark verdünnten Lösungen von Essigsäure eine intensive Trübung zeigen. Danach erscheint es fraglich, ob die Hüllen größere Mengen von Mucin enthalten. Wahrscheinlich ist es dagegen, daß manche Hüllen Fett eingelagert haben.

Winkler schließt aus dem Umstande, daß beim Kochen der Milch ein Teil der Hüllen der Fettkügelchen schmilzt und die Kügelchen zu größeren Tropfen zusammenfließen, „daß die Hüllen der meisten Fettkügelchen zum größeren Teile aus einer Fettmasse bestehen“ (S. 45). Ob nun der Anteil des Fettes an den Hüllen ein so erheblicher ist, wird sich schwer feststellen lassen. Bei den Hüllen, die sich in einer Tripalmitinemulsion bilden, kann man nur bei einigen wenigen der Tröpfchen wahrnehmen, daß ihre Hüllen Fett enthalten, und zwar sind es die großen Fettkügelchen mit sehr derben Membranen. Ich bereitete aus einer solchen Emulsion ein Trockenpräparat und färbte mit Indophenol. Die Kügelchen färbten sich nicht, da sie fest sind, dagegen konnte man an sehr derben Hüllen, die man, wie schon erwähnt, ohne weiteres sehen kann, beobachten, daß wenn man von der Seite her Amylalkohol zusetzt, ein Teil der Hülle zusehends verschwand. Um eine Schrumpfung oder um Wasserentziehung kann es sich dabei wohl nicht handeln, denn wenn eine solche eintreten sollte, so hätte dies schon die alkoholische Indophenollösung bewirkt. Das Dünnerwerden der Hüllen nach dem Zusatz von Amylalkohol kann man daher nur darauf zurückführen, daß der Amylalkohol Fett aus der Hülle herauslöst, während der Eiweißanteil, der noch immer eine sehr dicke Membran bildet, zurückbleibt. Daß bei den Milchfettkügelchen ähnliche Verhältnisse vorliegen, ist nicht unwahrscheinlich.

Bei Färbung der durch Äther freigelegten Hüllen mit Fuchsin bemerkte Völtz, daß sie sich mit verschiedener Intensität färben, und schließt daraus auf verschiedene chemische Zusammensetzungen der Hüllen; ähnliche Verschiedenheit in der Färbungsintensität habe auch ich mit dem schon erwähnten Gemisch von Ziehlscher Lösung und alkalischem Methylenblau gesehen. Auf eine verschiedene chemische Zusammensetzung der Hüllen deutet auch die von mir beobachtete Nichtfärbung eines Teiles der Fettkügelchen frisch gemolkener oder erwärmter Milch durch Fettfarbstoffe. Nach den Analysen von Völtz „besitzen

auch die Hüllen von später aufsteigenden Milchkügelchen eine sehr abweichende chemische Zusammensetzung. Zum Teil sind diese Differenzen darauf zurückzuführen, daß ein Stoffaustausch zwischen einigen die Serumhüllen aufbauenden Substanzen und gewissen Bestandteilen der umgebenden Milchflüssigkeit stattfindet. Jedoch weisen einige Versuchsergebnisse darauf hin, daß die Hüllen der früher aufsteigenden Milchkügelchen von denen der später gewonnenen individuell verschieden sind. Ferner hat die Größe der Fettkugeln einen Einfluß auf die chemische Zusammsetzung ihrer Hüllen".

Wenn auch Popp meint, daß die Methode von Völtz, die Fettkügelchen zu isolieren, noch nicht einwandfrei ist, da die Hüllen ihre Zusammensetzung während des Aufsteigens ändern können, so erscheint es doch plausibel, daß die Hüllen chemisch verschieden zusammengesetzt sind. Völtz bemerkt in der Zusammenfassung seiner Resultate: „Es gewinnt an Wahrscheinlichkeit, daß sich die Hüllen der Fettkügelchen bei ihrer Entstehung entsprechend der dann noch nicht fertigen Milch eben in anderer Weise bilden müssen als die Serumhüllen der in der fertigen Milch emulgierten Fetteile. (Völtz hat nämlich Butterfett in Magermilch emulgiert und die sich bildenden Hüllen analysiert und eine von den natürlichen Hüllen stark abweichende Zusammensetzung gefunden.) Darin liegt wohl auch ein Moment, daß später durch die Einwirkung des veränderten umgebenden Mediums sich auch die natürlichen Serumhüllen mit der Zeit in ihrer Zusammensetzung ändern." Die Zusammensetzung der Hüllen wird nicht nur von der Art der umgebenden Flüssigkeit, sondern höchstwahrscheinlich auch von der Art des emulgierten Fettes beeinflußt. Nach Sommerfeld, „Handbuch der Milchkunde" (S. 134) sollen die kleinen Fettkügelchen, deren Durchmesser weniger als anderthalb Mikra beträgt, mehr Olein und weniger flüchtige Fettsäuren enthalten als die größeren.

Daß die Zusammensetzung der Hüllen mit der Art des emulgierten Fettes zusammenhängt, glaube ich daraus schließen zu dürfen, daß sich die Hüllen, die sich in Emulsionen verschiedener Fette in ein und derselben Magermilch bilden, gegen ein und dieselben Farbstoffe ganz verschieden verhalten. Ich emulgierte Olivenöl in Magermilch. Nach 24stündigem Stehen bilden sich um die Fetttröpfchen Hüllen, die in alkalischem Methylenblau, in wässerigem Methylenblau und Ziehlscher

Lösung und Toluidinblau zerstört werden. Färbt man zuerst mit Toluidinblau und extrahiert dann mit Amylalkohol, so sind die Hüllen schwach gefärbt und sehr dünn. Läßt man die Eprouvette längere Zeit stehen, so bildet sich oben eine Ölschicht, darunter eine Schicht von rahmartigem Aussehen, die aus Fetttröpfchen besteht, die nicht zusammengeflossen sind und Hüllen haben. Emulgierte ich bei 50° C geschmolzenes, im Trockenschrank heiß filtriertes Butterfett in Magermilch, so bilden sich Hüllen, die sich nur in Ziehlscher Lösung auflösen, in den andern Farbstofflösungen dagegen gefärbt werden. Eine Emulsion von Tripalmitin zeigt die schon mehrmals erwähnten, ohne weiteres sichtbaren derben Hüllen, und diese weisen verschiedene Strukturen auf, sind körnig, strahlig und manche scheinen Risse zu haben. Sie färben sich mit alkalischem Methylenblau, Eosin, Toluidinblau; in Ziehlscher Lösung werden sie dagegen nur zum Teil zerstört. Bei allen diesen Färbungen kann man beobachten, daß sich der Farbstoff in einem sehr breiten gegen das Zentrum immer intensiver gefärbten Ring um die Hülle lagert, im Gegensatz zu den natürlichen Hüllen in der Milch (Fig. 2 und 3).

Wenn die Fettkügelchen in der Milch eine verschiedene Zusammensetzung haben, so ist es demnach sehr wahrscheinlich, daß auch die Hüllen in ihrer Zusammensetzung verschieden sind.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Die von Burri und Nußbaumer beobachtete Oberflächenspannungsdepression, die durch Kühlung hervorgerufen wird, beruht tatsächlich, wie die genannten Autoren vermuteten, auf dem Festwerden des Fettes.

2. Sie ist nämlich durch $^3/_4$stündiges Erwärmen auf 50° C fast ganz rückgängig zu machen.

3. Zeigt sie von der Höhe des Fettgehaltes eine gewisse Abhängigkeit, indem sie bei Magermilch mit einem Fettgehalte von 0,15% sehr gering ist, bei einem Fettgehalt von 0,5% fast gleich derjenigen der Vollmilch ist. Bei höheren Fettgehalten nimmt die Oberflächenspannungsdepression nur wenig zu.

4. Die Hüllen der Fettkügelchen sind tatsächlich feste Membranen, wie aus den Versuchen mit in Benzol gelöster

Butter, ferner mit Paraffin- und Tripalmitinemulsionen ersehen werden kann.

5. Sie enthalten wahrscheinlich teilweise Fett und sind in ihrer chemischen Zusammensetzung wahrscheinlich nicht alle gleich.

6. Die Hüllen der Milchfettkügelchen erleiden während des Säuerungsvorganges, ferner bei gewissen krankhaften Störungen der Milchbildung (z. B. Maul- und Klauenseuche und dem Fehler der ranzigen oder rässen Milch) durchgreifende chemische Veränderungen, deren Natur durch die Analyse vielleicht festgestellt werden könnte.

7. Durch den Säuerungsprozeß werden die Hüllen auch weniger widerstandsfähig gegen mechanische und thermische Einflüsse, da beim Verbuttern von pasteurisiertem und gesäuertem Rahm die Hüllen bis auf wenige Exemplare, bei nicht pasteurisiertem und gesäuertem Rahm nur zum Teil zertrümmert werden, während sie in Süßrahmbutter erhalten bleiben.

Über Atoxyl.

V. Mitteilung.

Von

Ferdinand Blumenthal und Emanuel Navassart.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Eingegangen am 10. April 1911.)

In der vorigen Mitteilung[1]) war die Rede von der erhöhten Giftigkeit der Substitutionsprodukte des Atoxyls durch Jod und Brom im Vergleich zum Atoxyl. Sie ist mindestens um das dreifache erhöht. Lange Zeit war uns die Ursache hierfür nicht klar. Kontrollversuche mit Jod- und Bromphenol zeigten uns, daß die Giftigkeit nicht etwa darauf beruhen konnte, daß Brom und Jod in aromatischer Verbindung vorhanden waren, da diese Verbindungen sehr wenig giftig waren.[2]) Die Sektionsprotokolle der Tiere zeigten eine vollkommene Übereinstimmung mit den durch Atoxyl vergifteten Tieren. Die Atoxylvergiftung ist charakterisiert durch Hyperämie der Niere an der Grenze der Rinden und Marksubstanz. Wir glaubten zuerst die starke Giftigkeit als eine Summation der Wirkung von Jod oder Brom mit Arsen auffassen zu sollen. Erst als wir bei der Behandlung von Menschen mit den Jod- und Brompräparaten wiederholt Ikterus und starke Schmerzen in der Lebergegend beobachteten, kamen wir auf die Idee, daß durch die Einführung von Jod und Brom in das Atoxyl eine besondere Affinität zu der Leber ev. zu anderen Organen hervorgebracht würde, worauf die Giftigkeit der jodierten und bromierten Arsenpräparate

---

[1]) Diese Zeitschr. 28, 9, 1910.

[2]) Deutsche med. Wochenschr. 1910, Nr. 49.

beruhen könnte. Aus den Versuchen an Kaninchen ging hervor, daß die Einspritzung von Atoxyl entweder zu gar keiner oder nur zur spurenweisen Ablagerung von Arsen in der Leber führt. Diese Erfahrung stimmt überein mit den Untersuchungen, die früher von F. Blumenthal und Ernst Jacoby veröffentlicht worden sind. Sie konstatierten nach den Atoxylinjektionen in allen Versuchen noch relativ reichliche Mengen Arsen im Blut, zu einer Zeit, wo sie entweder gar kein Arsen oder nur Spuren in den Geweben fanden. Dies konnten wir auch jetzt wieder bestätigen. Dagegen fanden wir bei einem mit Brom- oder Jodatoxyl vergifteten Kaninchen eine weitaus größere Menge Arsen in der Leber als bei den Atoxyltieren. Aus äußeren Gründen gingen wir jetzt dazu über, diese Frage bei Ratten zu studieren. Es hatte Wedemann früher festgestellt, daß bei Ratten nach Atoxyleinspritzungen Arsen hauptsächlich im Blut, aber auch in der Leber und anderen Organen nachzuweisen war. In der Regel war in der Leber erst nach 6 Stunden Arsen zu finden. Da es uns nun weniger darauf ankam, ob überhaupt in der Leber nach Atoxyleinspritzungen sich Arsen befindet, als vielmehr, ob bei Brom- und Jodatoxyleinspritzungen die Affinität der Leber für das Arsen erhöht ist, so spritzten wir gleiche Mengen Atoxyl bzw. Jod- und Bromatoxyl (0,01 g) den Tieren ein und töteten dieselben genau nach derselben Zeit, etwa 6 bis 8 Stunden nach der Injektion. Nach dieser Zeit fanden wir bei allen Atoxyltieren, mit Ausnahme eines einzigen, nur minimale Mengen Arsen in der Leber.

Als wir nun die gleiche Menge Jod- und Bromatoxyl einspritzten, war der Gehalt der Leber an Arsen um ein vielfaches vermehrt, wie sich aus der Intensität der Arsenspiegel mit Leichtigkeit feststellen ließ. Die Menge varierte, aber wir hatten bei diesen Tieren niemals ein negatives Resultat zu verzeichnen.

Der Arsennachweis geschah im Marshschen Apparat nach der von E. Salkowski angegebenen Methode der Zerstörung der organischen Substanzen. Die fein zerhackten Gewebe werden unter Zusatz von konzentrierter Salpetersäure so lange digeriert, bis die organischen Gewebe vollständig gelöst erscheinen und bei weiterem Zusatz von Salpetersäure keine Dämpfe von NO_2 mehr entweichen. Dann wird die Lösung im Kjeldahlkolben mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, bis die Salpetersäure verdampft ist und die Lösung farblos wird. Nach dem Erkalten wird die

Lösung verdünnt und falls dabei noch weitere Dämpfe auftreten, nochmals erhitzt. Die völlig von Salpetersäure und salpetriger Säure freie Lösung wird in den Marsh schen Apparat in der üblichen Weise gebracht. Zur Arsenbestimmung wurden immer die ganzen Organe verwandt. Die meisten Versuche sind der geringeren Kosten halber an Ratten angestellt. Es hat sich kein wesentlicher Unterschied in der Verteilung des Arsens bei diesen Tieren im Vergleich zum Kaninchen ergeben.

A. Atoxylversuche.

(Subcutan, p-amidophenylarsinsaures Natrium).

1. Ratte (ca. 80 g Gewicht) erhält 0,025 g, tot nach 8 Stunden. Leber: Arsengehalt negativ.

2. Ratte (ca. 80 g Gewicht) erhält um 12 Uhr mittags 0,02 g, tot um 8 Uhr. Leber: Arsenspiegel schwach.

3. Ratte (ca. 80 g Gewicht) erhält um 12 Uhr mittags 0,02 g, wird aber am nächsten Morgen um 10 Uhr getötet. Leber: Arsenspiegel negativ.

4. Ratte (ca. 75 g Gewicht) erhält um 12 Uhr mittags 0,02 g, wird aber am nächsten Morgen um 10 Uhr getötet. Leber: Arsenspiegel ziemlich deutlich.

5. Ratte (ca. 80 g Gewicht) erhält 0,01 g, wird nach 5 bis 6 Stunden getötet. Leber: Arsenspiegel Spur.

Ebenso. Leber: Arsenspiegel Spur.

B. Bromatoxyl (Dibromatoxyl).[1])

1. Ratte (ca. 80 g Gewicht) erhält 0,01 g, tot nach 5 bis 6 Stunden. Leber: Arsen Spur.

2. Ratte (ca. 80 g Gewicht) erhält 0,01 g, tot nach 5 bis 6 Stunden. Leber: Arsen deutlich.

3. Ratte (ca. 70 g Gewicht) erhält 0,01 g, tot nach 5 bis 6 Stunden. Leber: Arsen stark.

4. Ratte (ca. 70 bis 80 g Gewicht) erhält 0,01 g, tot nach 5 bis 6 Stunden. Leber: Arsenspiegel stark.

5. Ebenso. Leber. Arsenspiegel mäßig stark.

6. Ebenso. Leber: Arsenspiegel kolossal.

C. Jodatoxyl mit NH_2-Gruppe.

(p-amidojodphenylarsinsaures Natrium).

1. Ratte (ca. 80 g Gewicht) erhält 0,01 g, wird nach 6 Stunden getötet. Leber: Arsenspiegel stark.

2. Ebenso. Leber: Arsenspiegel stark.

3. Ebenso. Leber: Arsenspiegel stark.

---

[1]) Atoxyl IV, diese Zeitschr. 28, 91, 1910.

D. Jodatoxyl ohne NH_2-Gruppe.

(p-jodphenylarsinsaures Natrium.)

3 Ratten (ca. 80 g Gewicht) erhalten 0,01 g subcutan; sie werden nach 6 Stunden getötet.

In allen drei Fällen ist die Leber stark arsenhaltig.

Ein zweiter Weg, die Affinität der Gewebe für die einzelnen Arsenkörper zu prüfen, bestand in der Feststellung ihrer Ausscheidungsdauer. Diese Frage ist deshalb von Wichtigkeit, weil, je länger ein Präparat im Organismus verweilt, desto länger seine Wirkung besteht. Natürlich kommt hierbei auch die Durchlässigkeit der Nieren und die Schnelligkeit der Resorption in Betracht. Die beiden letzten Momente werden allerdings bei den in Wasser leicht löslichen Verbindungen keine wesentliche Rolle spielen. Ganz anders ist dies bei den unlöslichen Präparaten. A priori werden wir bei Versuchen, Mikroorganismen zu vernichten, solche Verbindungen bevorzugen, die bei gleicher Ungiftigkeit länger im Organismus verweilen. Wir bemerken, daß es sich dabei um Körper gleicher oder sehr ähnlicher Konstitution handeln muß, z. B. um die verschiedenen Salze derselben Säure, mit annähernd gleichen Arsengehalt. Die Unterscheidung der Dreiwertigkeit des Arsens gegenüber der Fünfwertigkeit spielt dabei keineswegs die Rolle, die ihm neuerdings allgemein zugeschrieben wird.[1]) Durch die Güte des Herrn Professor A. Michaelis in Rostock, der zuerst die Phenylarsinsäure und das Arsenobenzol im Jahre 1881 dargestellt hat, standen uns noch einige von ihm dargestellte Arsenpräparate zur Verfügung, die wir gleichfalls toxikologisch untersucht haben.

Versuch Nr. 1. Einem Kaninchen von 2550 g werden am 18. Oktober 0,1 g Bromatoxyl eingespritzt (p-amidodibromphenylarsinsaures Natrium).

Am 19. Oktober. Urinmenge 95 ccm, der Urin enthält stark Eiweiß und Zylinder, die a-Naphtholprobe[2]) ist positiv.

Am 20. Oktober. Urinmenge 50 ccm, Albuminurie ist noch stärker als am 19. Das Tier ist schwer krank. Die a-Naphtholprobe ist positiv; der Urin auf Arsen untersucht, gibt einen starken Arsenspiegel.

---

[1]) Diese ist nur im Reagensglas und im Tierversuch vorhanden; dagegen hat sich beim Menschen das 3 wertige Arsenophenylglycin bei der Schlafkrankheit weniger wirksam gezeigt als das Atoxyl, in dem das Arsen 5 wertig ist. (Scherschmidt und andere, Deutsche med. Wochenschr. 1911, Febr.).

[2]) Diese Zeitschr. 10, 240, 1908.

Am 21. Oktober. Urinmenge 75 ccm, starker Eiweißgehalt, die a-Naphtholprobe ist negativ, das Tier ist sehr krank, der gesamte Urin auf Arsen geprüft, gibt einen minimalen Arsenspiegel.

Am 22. Oktober. Urinmenge 40 ccm, Eiweißgehalt sehr stark, Arsenspiegel minimal.

Am 24. Oktober. Das Tier ist abends tot. Bei diesem Kaninchen dauerte die starke Arsenausscheidung 48 Stunden lang, dann noch 2 Tage lang Spuren, es trat sehr schnell eine Nephritis auf, an der das Tier starb. Die Leber des Kaninchens gab einen geringen Arsenspiegel. Das Gehirn enthielt kein Arsen.

Versuch Nr. 2. Ein Kaninchen von Gewicht 2215 g erhält am 19. Oktober p-jodphenylarsinsaures Natrium 0,1 g subcutan.

Am 20. Oktober. Urinmenge 150 ccm, kein Eiweiß, enormer Arsenspiegel. Das Tier ist krank.

Am 21. Oktober. Urinmenge 40 ccm, Eiweiß Spur, geringer Arsenspiegel.

Am 22. Oktober. Urinmenge 35 ccm, Eiweiß stark, minimaler Arsenspiegel. Der am 23. und 24. Oktober gelassene Harn, 340 ccm, enthält nur noch Spuren von Arsen. Das Tier ist vollständig gesund. Der Arsenspiegel von dieser 2tägigen Urinmenge ist gering.

Am 25. Oktober. Arsenspiegel minimal.

Am 26. Oktober. Arsenspiegel negativ.

Eine stärkere Arsenausscheidung bestand bei diesem Tier 48 Stunden, dann wurden noch Spuren 48 Stunden lang ausgeschieden.

Versuch Nr. 3. Ein Kaninchen von 2830 g erhält am 31. Oktober 0,2 g Bromatoxyl. Bis zum 4. November besteht vollständige Anurie. An diesem Tage werden 15 ccm Harn entleert. Der Harn enthält Gallenfarbstoff und Blut; die a-Naphtholprobe ist positiv.

Am 5. November. 25 ccm Harn. Gallenfarbstoff und Blut; die a-Naphtholprobe ist positiv.

Am 6. und 7. November. 80 ccm Harn, Gallenfarbstoff und Blut positiv, a-Naphtholprobe schwach.

Am 8. November stirbt das Tier.

Versuch Nr. 4. Ein Kaninchen von 2770 g erhält 0,1 g Hectin[1]) (Benzosulfoatoxyl) am 19. Oktober. Nach 6 Stunden werden 100 ccm Harn gelassen, die a-Naphtholprobe ist positiv.

Am 20. Oktober sind 280 ccm Harn gelassen, das Tier ist gesund, die a-Naphtholprobe ist zweifelhaft, der Arsenspiegel stark.

Am 21. Oktober 325 ccm Harn, die a-Naphtholprobe ist negativ, Eiweiß negativ, Arsenspiegel zweifelhaft.

Am 22. Oktober 200 ccm Harn, Arsenspiegel negativ.

Am 23. und 24. Oktober zusammen 1250 ccm Harn, Arsenspiegel negativ.

Es war in diesen beiden Fällen binnen 16 Stunden alles Arsen bis auf die letzte Spur ausgeschieden.

---

[1]) Das Präparat verdanke ich der Güte des Herrn Prof. Mouneyrat, der diesen Körper zuerst dargestellt hat.

Versuch Nr. 5. Ein Kaninchen von 2690 g erhält am 24. Oktober mittags 12 Uhr 0,1 g Atoxyl subcutan.

Am 25. Oktober 270 ccm Harn, Eiweiß minimal, die a-Naphtholprobe ist positiv.

Am 26. Oktober 350 ccm Harn, die a-Naphtholprobe ist negativ, Arsenspiegel stark.

Am 27. Oktober Urinmenge 190 ccm, kein Eiweiß, Arsenspiegel minimal.

Am 28. Oktober 250 ccm Harn, Arsenspiegel negativ.

Die Arsenausscheidung dauerte stark ca. 48 Stunden lang, eine geringe Menge wurde noch am dritten Tage ausgeschieden.

Versuch Nr. 6. Ein Kaninchen von 3170 g erhält 0,3 g derselben Verbindung subcutan am 26. Oktober.

Am 27. Oktober 110 ccm Harn, a-Naphtholprobe positiv.

Am 28. Oktober 110 ccm Harn, a-Naphtholprobe negativ, Spuren von Eiweiß, Arsenspiegel deutlich.

Am 29. Oktober kein Harn.

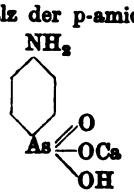
Am 30. und 31. Oktober sind zusammen 280 ccm Harn vorhanden, Arsenspiegel stark.

Am 1. November 160 ccm Harn, Arsenspiegel negativ.

Am 2. und 3. November zusammen 490 ccm Harn, Arsenspiegel negativ.

Die Arsenausscheidung dauerte hier in beträchtlichem Maße 3 Tage lang.

Versuch Nr. 7. Ein Kaninchen erhält am 16. Februar 0,1 g Kalkatoxyl (Monocalciumsalz der p-amidophenylarsinsäure).



Am 17. Februar sind 250 ccm Harn entleert, der Harn enthält kein Eiweiß, die a-Naphtholprobe ist sehr stark.

Am 18. Februar. Der Urin, 480 ccm, ist eiweißfrei, die a-Naphtholreaktion ist negativ, Arsenspiegel schwach.

Am 19. und 20. Februar 810 ccm, eiweißfrei, Arsenspiegel deutlich (2 Tage-Urin).

Am 21. Februar Urinmenge 290 ccm, Arsenspiegel negativ.

Am 22. Februar Urinmenge 310 ccm, Arsenspiegel negativ.

Die Arsenausscheidung dauerte 24 Stunden stark, dann noch 3 Tage schwach.

Versuch Nr. 8. Am 26. November erhält ein großes Kaninchen 0,3 g Kalkatoxyl.

Am 28. November ist der Urin eiweißfrei, die a-Naphtholreaktion positiv.

Am 29. November werden 130 ccm Harn ausgeschieden, der Urin enthält etwas Eiweiß, die a-Naphtholprobe ist positiv.

Am 30. November Urin 160 ccm com, eiweißfrei, die a-Naphtholprobe schwach, der Arsenspiegel zeigt etwa $^1/_{20}$ mg an.

Am 1. Dezember Urin 110 ccm, Arsenspiegel schwach.

Am 2. Dezember ist das Kaninchen krank, Urin 28 ccm eiweißfrei, Arsenspiegel negativ.

Am 3. Dezember ist das Kaninchen tot. Die Leber wird auf Arsen geprüft, sie enthält eine Spur Arsen. Die Arsenausscheidung dauert 72 Stunden lang; Spuren erschienen noch länger im Harn.

Versuch Nr. 9. Kaninchen, das ca. 2 kg wiegt, bekommt am 21. Dezember 0,4 g Hectin (Benzosulfatoxyl).

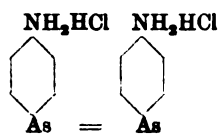
Am 22. Dezember ist kein Harn entleert.

Am 23. Dezember werden 25 ccm Harn entleert, das Tier ist tot.

Der Urin gibt die a-Naphtholreaktion und enthält Eiweiß, die Leber enthält reichliche Mengen Arsen, die Niere Spuren, Gehirn, Augen, Milz und Lunge negativ.

Versuche mit schwer löslichen bzw. in Wasser unlöslichen Arsenverbindungen.

Versuch Nr. 1. Ein Kaninchen von 2060 g erhält 0,1 g Salzsäurearsenanilin in Öl verrieben am 18. Oktober.



Am 19. Oktober Urinmenge 65 ccm, Spur Eiweiß, die a-Naphtholprobe ist positiv.

Am 20. Oktober Urinmenge 190 ccm, kein Eiweiß, die a-Naphtholprobe ist positiv, Arsenspiegel stark.

Am 21. Oktober 450 ccm Harn, a-Naphtholprobe schwach, Arsenspiegel schwach.

Am 22. Oktober 360 ccm Harn, a-Naphtholprobe negativ, Arsenspiegel minimal.

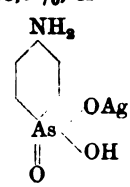
Am 23. und 24. Oktober Urinmenge 850 ccm, Arsenspiegel negativ.

Am 25. Oktober Arsenspiegel ganz minimal.

Am 26. Oktober Urinmenge 420 ccm, Arsenspiegel negativ.

Es dauerte also die Arsenausscheidung 3 Tage (72 Stunden) stark, eine schwächere ist noch länger vorhanden.

Versuch Nr. 2. Ein Kaninchen von 3080 g erhält 0,1 g Monosilberatoxyl in Öl suspendiert am 24. Oktober (p-amidophenylarsinsaures Silber). Silbergehalt 33,3%, Arsengehalt 23,1%.



Am 25. Oktober Urinmenge 450 ccm, kein Eiweiß, die a-Naphtholprobe ist positiv.

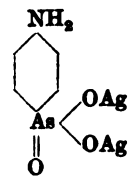
Am 26. Oktober Urinmenge 500 ccm, Arsenspiegel mäßig stark, die a-Naphtholprobe ist negativ.

Am 27. Oktober Urinmenge 250 ccm, Arsenspiegel Spur.

Am 28. Oktober Urinmenge 475 ccm, kein Eiweiß, Arsenspiegel negativ.

Eine reichlichere Arsenausscheidung dauerte 48 Stunden, dann wurde am dritten Tage noch eine Spur ausgeschieden.

Versuch Nr. 3. Ein Kaninchen von 2320 g erhält am 31. Oktober 0,3 g des Disilbersalzes. Silbergehalt 50%, Arsengehalt 17,4%.



Am 1. November Anurie.

Am 2. November 110 ccm Harn, a-Naphtholreaktion sehr stark.

Am 3. November 210 ccm Harn, a-Naphtholreaktion positiv, Spur Eiweiß.

Am 4. November mäßiger Arsenspiegel.

Am 5. November 365 ccm Harn, Arsenspiegel negativ.

Es dauerte also die Arsenausscheidung ca. 5 Tage.

Versuch Nr. 4. Am 22. Februar wird einem Kaninchen 0,1 g Monosilberatoxyl in Öl suspendiert eingespritzt.

Am 23. Februar sind 110 ccm Harn gelassen, die a-Naphtholprobe ist sehr stark, die Eiweißprobe negativ.

Am 24. Februar sind 170 ccm Harn gelassen, die a-Naphtholprobe ist negativ, Eiweißprobe negativ, Arsenspiegel deutlich.

Am 25. Februar fortgegossen.

Am 26. Februar 390 ccm Harn, Arsenspiegel minimal.

Am 27. Februar Arsenspiegel negativ.

Es dauerte die Arsenausscheidung 48 Stunden.

Versuch Nr. 5. Ein Kaninchen erhält 0,1 g Disilbersalz der p-Amidophenylarsinsäure in Öl suspendiert am 24. Februar.

Am 25. und 26. Februar sind 370 ccm Harn entleert. Die a-Naphtholprobe ist stark, der Urin ist eiweißfrei.

Am 27. Februar Urin fortgegossen.

Am 28. Februar 310 ccm Urin, Arsen: starker Spiegel.

Am 1. März Urinmenge 490 ccm, Arsenspiegel minimal.

Am 2. März Arsenspiegel negativ.

Die Arsenausscheidung dauerte 4 Tage.

Versuch Nr. 6. Ein Kaninchen von 2820 g Gewicht erhält am 21. Februar 0,1 g atoxylsaures Quecksilber in Öl suspendiert.

Am 22. Februar sind 70 ccm Harn gelassen, die a-Naphtholprobe ist sehr stark, die Eiweißprobe negativ.

Am 23. Februar sind 190 ccm Harn gelassen, Eiweißprobe negativ, a-Naphtholprobe schwach.

Am 24. Februar sind 275 ccm Harn gelassen, a-Naphtholprobe negativ, Eiweißprobe negativ, Arsenspiegel mäßig stark.

Am 25. Februar Urinmenge 420 ccm, Arsenspiegel negativ.

Die Arsenausscheidung dauerte 3 Tage.

Versuch Nr. 7. 0,2 g Dimethylanilinarsenoxyd (Michaelis) $C_6H_4\begin{cases}N(CH_3)_2\\AsO\end{cases}$ in Öl verrieben, werden einem großen Kaninchen am 23. November eingespritzt. Nach 7 Stunden ist das Tier tot.

Versuch Nr. 8. Am 25. November wird 0,1 g Dimethylanilinarsenoxyd in Salzsäure gelöst und mit Natronlauge soweit neutralisiert, daß es eben noch sauer ist. Es wird einem Kaninchen von 1750 g injiziert. Nach 7 Stunden ist das Tier tot.

Versuch Nr. 9. Ein großes Kaninchen bekommt 0,1 g Dimethylanilinarsenoxyd in Öl. Das Tier macht bald nach der Einspritzung einen schwerkranken Eindruck und stirbt in der Nacht.

Versuch Nr. 10. Am 1. Dezember bekommt ein Kaninchen von 2070 g 0,05 g tertiäres Dimethylarsenanilin (Michaelis) in Öl.

Am 2. Dezember sieht das Tier gesund aus, der Harn, 260 ccm, enthält reichliche Mengen Arsen.

Am 3. Dezember ist das Tier ganz gesund, Harn, 190 ccm, enthält deutliche Mengen Arsen.

Am 5. Dezember Harn von 48 Stunden, 1120 ccm, eiweißfrei, Arsen negativ.

Die Arsenausscheidung dauerte ca. 48 Stunden.

Versuch Nr. 11. 0,25 g Dioxydiamidoarsenobenzol (Salvarsan) werden in 20 ccm alkalischer, wässeriger Lösung gelöst, davon 10 ccm = 0,125 g einem Kaninchen, das 3270 g wiegt, subcutan eingespritzt am 15. Dezember.

Am 16. Dezember macht das Kaninchen einen kranken Eindruck, hat nichts gefressen und keinen Harn gelassen.

Am 17. Dezember sind 170 ccm Harn gelassen, der Arsenspiegel ist enorm.

Am 19. Dezember werden 380 ccm Harn ausgeschieden. Arsenspiegel sehr stark. Kaninchen gesund.

Das Kaninchen bekommt zum zweiten Male 0,1 g Hata von demselben Präparat, das anscheinend nicht verändert ist.

Am 20. Dezember 55 ccm Harn eiweißfrei, Arsenspiegel sehr stark.

Am 22. Dezember Harn, 980 ccm von 48 Stunden, eiweißfrei, Arsenspiegel stark.

Am 23. Dezember Harn. 410 ccm, nicht weiter untersucht.

Am 28. Dezember bekommt das Kaninchen zum dritten Male 0,2 g Hata und überlebt auch diese Einspritzung. Es wird nach 8 Tagen aus dem Versuch entlassen. Es hat je eine 5 Markstückgroße Nekrose an den Injektionsstellen.

Versuch Nr. 12. Kaninchen von ca. 1900 g erhält subcutan am 19. Dezember 0,25 g Salvarsan in alkalischer Lösung.

Am 20. Dezember sind 350 ccm Harn gelassen, eiweißfrei, Arsenspiegel enorm.

Am 21. Dezember bekommt das Kaninchen 0,125 g Salvarsan zum zweiten Male.

Am 22. Dezember sind 150 ccm Harn gelassen, eiweißfrei, Arsenspiegel stark. Auch dieses Tier bleibt gesund. Es wird später zu anderen Versuchen gebraucht, wobei es eingeht. Zeigt gleichfalls eine mächtige Nekrose.

Versuch Nr. 13. Kaninchen von 2 kg erhält 0,125 g Salvarsan subcutan in alkalischer Lösung am 21. Dezember.

Am 22. Dezember sind 720 ccm Harn entleert, Arsenspiegel enorm; Die Arsenausscheidung dauert bis zum 26. Dezember.

Am 28. Dezember bekommt das Tier zum zweiten Male eine Injektion von 0,2 g Salvarsan. Das Kaninchen ist anscheinend ganz gesund und stirbt unerwartet am 28. Januar. Es zeigt sich nach der Entfernung der Haut, vom Rücken ausgehend, das ganze Peritoneum überziehend; eine mächtige Nekrose. Leber und Niere sind vollständig blaß, vermutlich infolge der schweren parenchymatösen Blutungen, die sich in dem Darm vorfinden, und die dem ganzen Dünndarm und Dickdarm ein blutigrotes Aussehen verleihen.

Versuch Nr. 14. Ein Kaninchen, Gewicht 2850 g, erhält am 16. Februar 0,1 g Arsenodimethylanilin (Michaelis) $(CH_3)_2NC_6H_4As = AsC_6H_4N(CH_3)_2$ in Öl verrieben. Nach $4^1/_2$ Stunden ist das Tier tot.

Versuch Nr. 15. Ein fast ebenso großes Kaninchen erhält 0,1 g Dimethylarsenanilin (Michaelis) am 16. Februar.

Am 17. Februar hat das Tier 135 ccm Harn entleert, derselbe enthält kein Eiweiß, auf Arsen geprüft zeigt er einen kolossalen Spiegel. Das Tier scheint gesund zu sein.

Am 18. Februar sind 500 ccm Harn entleert, derselbe ist eiweißfrei, die Prüfung auf Arsen ergibt starken Spiegel.

Am 19. und 20. Februar zusammen 980 ccm Harn, eiweißfrei, starker Arsenspiegel.

Am 21. Februar 340 ccm Harn, eiweißfrei, deutlicher Arsenspiegel.

Am 22. Februar 270 ccm Harn, Arsenspiegel minimal.

Am 23. Februar Arsenspiegel negativ.

Die Arsenausscheidung dauert 5 Tage.

Aus den Versuchen mit annähernd gleichen Mengen (0,1 g) wasserlöslicher Arsenverbindungen geht hervor, daß das Arsen beim Hektin, das ja auch am wenigsten Arsen (17%) enthält, am schnellsten ausgeschieden wurde; bereits nach 16 Stunden war die Arsenausscheidung beendet. Dann folgt das Atoxyl, bei dem die As-Ausscheidung im wesentlichen nach

48 Stunden beendet war, spurweise Ausscheidungen folgten noch in den nächsten Tagen. Ungefähr gleich ist die Ausscheidung beim Kalkatoxyl. Weit länger dauert die Arsenausscheidung bei den giftigen Präparaten, Brom- und Jodatoxyl. Hier dürfte wohl bereits bei der angewandten Dosis eine Schädigung der Nieren aufgetreten sein, wodurch es dann zu einer langsameren Ausscheidung kommt. Mehr noch verlängert sich die Arsenausscheidung bei den wasserunlöslichen Präparaten infolge der langsameren Resorption. Auch hier spielt die Giftigkeit selbstverständlich eine gewisse Rolle, indem das Quecksilberatoxyl, das viel giftiger ist als das Silberatoxyl, längere Zeit zur Ausscheidung braucht als dieses. Die Arsenausscheidung nach der Salvarsaninjektion dauerte 5 Tage. Recht wenig giftig ist das tertiäre Dimethylarsenanilin von Michaelis, bei dem die As-Ausscheidung 4 bzw. 5 Tage dauert. Demnach kann man wohl daraus folgern, daß die Schnelligkeit der Ausscheidung der aromatischen Arsenkörper abhängig ist: 1. von ihrer Wasserlöslichkeit, 2. von ihrer Giftigkeit. Je giftiger ein Präparat ist, desto langsamer wird es ausgeschieden[1]), dagegen ist der umgekehrte Satz nicht richtig. Eine weitere Frage ist, ob nicht mit dem längeren Verweilen einer Substanz im Organismus auch eine größere Wirksamkeit verbunden ist. Das ist nicht ohne weiteres der Fall, so verliert anscheinend die Arsengruppe im Quecksilberatoxyl an Wirksamkeit den Trypanosomen gegenüber, obwohl ein Gewichtsteil der Verbindung die gleiche Menge Arsen und in derselben Konstitution enthält wie im Atoxyl. Dieses Präparat wirkt auch toxikologisch im wesentlichen als Quecksilberpräparat. Die Sektionsbefunde der gestorbenen Tiere zeigen alle Erscheinungen der Quecksilber-, nicht der Arsenvergiftung. Dagegen nimmt bei dem Quecksilberpräparat die spirillocide Wirkung erheblich zu, wie Uhlenhuth feststellte. Es handelt sich hierbei wohl um eine Summierung der Arsen- und Quecksilberwirkung. Die Einführung des Jodes in das Atoxyl hat merkwürdigerweise zur Folge, daß die Wirkung gegen die Spirochäten anscheinend nicht vermehrt wird, während die trypanocide Wirkung abnimmt. Die Giftigkeitszunahme dagegen ist eine sehr beträchtliche.

---

[1]) Vermutlich wegen seiner Schädigung der Nieren.

Versuche über den Arsengehalt der einzelnen Organe nach subcutaner Darreichung wasserlöslicher Arsenpräparate.

1. Versuche mit Atoxyl.

Versuch Nr. 1. 2 Ratten, die je 70 g wiegen, erhalten 0,03 g Atoxyl am 8. November. Die eine Ratte stirbt in der Nacht zum 9. November, die andere wird am nächsten Morgen um $^1/_2$11 Uhr getötet.

1. Ratte. Augen: deutlicher Arsenspiegel, Leber: mäßiger Arsenspiegel.

2. Ratte. Augen: deutliche Spur, geringer als bei der 1. Ratte, Leber: zweifelhafte Spur.

Versuch Nr. 2. Am 19., 20. und 21. November erhalten 2 Ratten je 0,01 g Atoxyl. Am 22. November werden sie getötet.

1. Ratte. Augen: negativ, Gehirn: minimale Spur, Leber: deutliche Menge Arsen.

2. Ratte. Augen: Arsen negativ, Gehirn: Spur, Leber: deutlich.

Versuch Nr. 3. 2 Ratten erhalten je 0,01 g Atoxyl. Die erste wird nach 6 Stunden getötet, die andere bleibt dauernd gesund. Die Organe der 1. Ratte werden auf Arsen geprüft. Gehirn: negativ, Augen: negativ, Leber: deutlich, Milz: negativ, Lunge: Spur, Nieren: zweifelhaft.

2. Versuche mit phenylarsinsaurem Natrium (Michaelis).

Versuch. Am 10. Januar erhält eine Ratte 0,01 g Phenylarsinsäure in Natronlauge gelöst. Nach 6 bis 7 Stunden wird die Ratte getötet. Die Organe werden untersucht, Leber, Milz, Gehirn, Lunge negativ, die Nieren enthalten eine Spur Arsen.

3. Versuche mit p-amidophenylarsinsaurem Calcium.

Versuch. Eine Ratte wird am 2. Januar mit 0,01 g gespritzt. Nach 6 bis 7 Stunden wird das Tier getötet. Leber: Arsengehalt sehr deutlich, Lunge: Spur, Milz, Niere, Augen, Gehirn: negativ.

4. Versuche mit Salvarsan (Dioxydiamidoarsenobenzol).

Versuch. Am 15. Dezember werden 2 Ratten mit je 0,05125 g Salvarsan, das in Natronlauge gelöst war, gespritzt. Die eine Ratte wird nach 6 Stunden getötet, die andere wird vorübergehend krank und bleibt dann gesund. Die Organe der getöteten Ratte werden untersucht, Leber: Arsengehalt sehr stark, Lunge: sehr stark, Gehirn, Augen: negativ, Milz und Niere: Spur.

Die 2. Ratte wird nach 4 Tagen getötet, Augen: Arsengehalt zweifelhaft, Leber, Lunge, Gehirn, Milz, Nieren: negativ.

Versuch mit 0,01 g Salvarsan. Eine Ratte erhält am 17. Februar 0,01 g Salvarsan. Nach 7 Stunden wird das Tier getötet. Die Leber enthält eine deutliche Spur, Niere: einen schwachen Spiegel, Gehirn und Lunge negativ.

5. Versuche mit Hektin.

Versuch. Eine Ratte erhält am 17. Februar 0,01 g Hektin. Sie wird nach 7 Stunden getötet. Der Arsengehalt der Organe ist folgender. Leber: geringer Spiegel, Niere: negativ, Gehirn: minimale Spur, Lunge: negativ.

Versuche über den Arsengehalt der einzelnen Organe nach subcutaner Darreichung in Wasser unlöslicher aromatischer Arsenpräparate.

Versuch Nr. 1. Am 14. Januar wird eine große Ratte mit 0,01 g p-Amidophenylarsinoxyd gespritzt, 0,1 g wurde in 10 ccm verdünnter Natronlauge gelöst, ein kleiner Teil löst sich nicht. Es wurde eine Suspension (1 ccm) eingespritzt. Die Ratte stirbt nach 5 Stunden. Die Organe wurden auf Arsen untersucht. Leber: deutlich, Nieren: stark, Lunge, Augen, Milz, Gehirn: negativ.

Versuch Nr. 2. In gleicher Weise wiederholt am 19. Januar. Lunge, Gehirn, Augen und Milz: negativ, Leber: stark, Nieren: sehr stark.

Versuch Nr. 3. Eine Ratte erhält am 17. Januar 0,01 g Dimethylanilinarsenoxyd in Öl verrieben. Ein Teil fließt wieder heraus. Die Ratte ist am selben Tage gesund. Sie stirbt am 25. Januar.

Versuch Nr. 4. Eine Ratte erhält am 25. Januar 0,01 g Dimethylanilinarsenoxyd in 1 ccm Öl von einer Mischung von 0,1 g in 10 ccm Öl. Sie stirbt am 27. Januar. Bei der Sektion zeigt sich hämorrhagische Nephritis. Die Organe werden auf Arsen untersucht. Weder Leber, Lunge, Gehirn, Augen enthalten Arsen, es war also bereits alles Arsen im Augenblick des Todes ausgeschieden.

Versuche mit Sarkomratten.

Versuch Nr. 1. Eine Ratte, die einen ziemlich großen Tumor hat, erhält 0,025 Atoxyl am 8. November. Sie stirbt in der Nacht vom 10. zum 11. November. Es werden auf Arsen untersucht, die Augen, der Tumor, die Leber, das Gehirn. Die Untersuchung ergibt: Augen: negativ, Tumor: Gewicht 17 g, ziemlich starker Arsenspiegel, Leber: Gewicht 3 g, ziemlich starker Arsenspiegel, Gehirn: negativ. Wenn man das Gewicht der Leber und des Tumors vergleicht, so war entschieden in der Leber pro Gramm mehr Arsen vorhanden.

Versuch Nr. 2. Eine Ratte mit einem taubeneigroßem Sarkom erhält 0,025 Atoxyl am 8. November. Sie stirbt in der Nacht vom 10. zum 11. November. Die Organe werden auf Arsen untersucht. Die Augen und das Gehirn enthalten kein Arsen, der Tumor, 7 g, gibt einen deutlichen Arsenspiegel, die Leber, 2,5 g, enthält eine minimale Spur.

Versuch Nr. 3. Am 28. Dez. werden 2 Ratten mit hühnereigroßem Tumor mit 0,01 g Atoxyl gespritzt. Nach 6 Stunden werden sie getötet.

1. Ratte: Der Tumor, 13 g, gibt einen deutlichen Arsenspiegel, die Leber einen schwachen Arsenspiegel, Lunge und Nieren geben einen zweifelhaften Spiegel, Gehirn, Augen und Milz sind negativ.

2. Ratte: Der Tumor, 24 g, gibt einen mäßigen Arsenspiegel, die Leber, 8 g, eine deutliche Spur. Der Spiegel der Leber ist, selbst wenn man das Gewicht der Leber im Verhältnis zum Tumor berücksichtigt, größer pro Gramm Substanz berechnet als bei dem Tumor. Lunge, Gehirn, Augen, Nieren und Milz geben ein negatives Resultat.

Versuch Nr. 4. Am 10. Januar 1911 werden 2 Ratten mit Sarkomen mit 0,01 g amidiertem Jodatoxyl gespritzt. Nach 7 Stunden werden sie getötet.

1. Ratte: Der Tumor, 1,5 g, enthält eine zweifelhafte Menge, Lunge, Nieren, Gehirn, Augen, Milz: negativ.

2. Ratte: Der Tumor, 6 g, enthält eine deutliche Menge, die Leber zeigt einen starken Arsenspiegel, Lunge, Nieren, Augen und Milz: negativ.

Bei den wasserlöslichen Präparaten zeigten sich keine großen Unterschiede in der Affinität zu den Geweben, wenn das Tier ca. 6 Stunden nach der Einspritzung getötet wurde; nur in der Leber wurden meist geringe Mengen Arsen gefunden. Ausgenommen waren die Brom- und Jodverbindungen, bei denen es zu erheblicherer Ablagerung von Arsen in der Leber kam. Bei den in Wasser schwer löslichen Verbindungen war die Affinität zu den Geweben bei dem Tode der Tiere anscheinend eine größere, aber man darf wohl annehmen, daß infolge der langsameren Resorption im Moment des Todes des Tieres noch nicht alles resorbiert gewesen ist.

Einige Versuche an tumortragenden Ratten (Sarkom) ergaben eine gewisse Affinität des Tumorgewebes für Arsen; wenn man aber die Größe der Tumoren mit den einzelnen Organen vergleicht, so hat sich bisher diese Affinität nicht als sehr stark erwiesen; sie scheint für die untersuchten Präparate (Atoxyl, Jodatoxyl, Hektin) geringer zu sein als die Affinität des Lebergewebes für diese Produkte. Doch sind die Untersuchungen noch zu wenig zahlreich, um einen endgültigen Schluß zu gestatten.

Alle diese Angaben gelten nur für die einmalige Injektion. Für mehrmalige Injektionen mögen die Verhältnisse anders liegen. Solche Versuche sollen nunmehr angestellt werden, sie sind um so wichtiger, als die schädigenden Wirkungen, z. B. des Atoxyls nur nach wiederholter Injektion des Atoxyls beobachtet wurden und die Hoffnung auf Verwirklichung der Therapia magna sterilisans bei der Syphilis als aufgegeben gelten kann.

Beiträge zum Kalkstoffwechsel.

II. Mitteilung.

Der Kalkgehalt des menschlichen Blutes nach Verabreichung großer Dosen Kalk per os.

Von

N. Voorhoeve.

(Mitteilungen aus dem Laboratorium der inneren Universitätsklinik in Amsterdam.)

(Eingegangen am 8. April 1911.)

Die Bedeutung des Calciums für den Organismus und die Vielseitigkeit seiner Rolle im tierischen Haushalt geht aus den verschiedensten Arbeiten der letzten Jahre hervor, und der Kalk nimmt jetzt eine ganz hervorragende Stelle in der Physiologie und Pathologie des Stoffwechsels ein. Wie anregend es auch sein möge, die neueren und älteren Forschungen auf diesem Gebiete kritisch zu beleuchten, so werde ich hier darauf verzichten, denn man müßte sonst fast die ganze Pathologie durchgehen. Bei den meist verschiedenen Lebensäußerungen und pathologischen Zuständen findet man den Kalk immer als einen bedeutenden Faktor wieder.

Ich brauche nur zu erinnern an die Untersuchungen über Kalk und Rachitis und Osteoporose, über den Einfluß des Kalkes auf den Wassergehalt des Organismus, auf die Diurese, auf Exsudate und Transsudate; an seine Bedeutung für das Leben der Säugetiere, der niedrigeren Tiere und deren Eier; an die Wechselwirkung zwischen Kalk-, Magnesium- und Phosphorstoffwechsel, zwischen Kalkstoffwechsel und Sekretion der Blutdrüsen; an die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von der Art der Nahrung und vom Zustande des Darmes; an die Untersuchungen über Kalk und Tuberkulose, Pneumonie, Diabetes, Albuminurie, Nephritis, Arteriosklerose, Akromegalie, Basedowsche Krankheit, Phosphaturie, Oxalurie, Tetanie, Epilepsie, exsudative Diathese, Serum-

krankheit, Zahncaries usw.; an die Beeinflussung der Muskelwirkung und Erregbarkeit der Nerven durch Kalk; an die Untersuchungen über Kalkstoffwechsel während Menstruation, Schwangerschaft und Stillperiode; an die Bedeutung des Kalkes für die Blutgerinnung, und last not least für die Chemotaxis und die Phagocytose. Ja, Röse[1]) kommt sogar nach sehr ausgedehnten Untersuchungen zum Schluß, daß die Bevölkerung ganzer Gegenden den nachteiligen Einfluß des Kalkmangels erfährt.

Die vorliegende Arbeit hängt eng zusammen mit seit Jahren planmäßig angestellten Untersuchungen über den Kalkstoffwechsel. Ich stellte mir hierbei die Aufgabe zu untersuchen, ob der günstige Einfluß, den der Kalk bei einigen Infektionskrankheiten, z. B. bei Pneumonie, haben sollte, seine Ursache in der Aktivierung irgendeines Abwehrmittels des Organismus fand (Beeinflussung von Opsoninen, Antikörper, Beförderung der Leukocytose, Phagocytose, Chemotaxis).

Aus besonderen Gründen sah ich mich veranlaßt, jetzt schon einen Teil meiner Arbeit zu veröffentlichen. Von meinen noch nicht publizierten Voruntersuchungen will ich hier nur das Resultat mitteilen. Ich fand nämlich bei erwachsenen gesunden und leicht erkrankten Männern eine bedeutende Kalkretention im Organismus, wenn ich ihnen pro die eine Extragabe von 15 g Calcium lacticum per os verabreichte, und weiter, daß diese Retention wochenlang fortdauerte, so lange als nur die Extrakalkgabe genommen wurde. Nachdem dies erst festgestellt war, ließen mich die inzwischen von Hamburger mitgeteilten Experimente dem Blute besondere Aufmerksamkeit widmen. Hamburger[2]) fand, daß in vitro bei Pferdeblut die Phagocytose stark von dem Kalkgehalt des Blutes resp. Serums abhängig ist, und zwar in der Weise, daß bis zu einem gewissen Maximum die Phagocytose um so stärker ist, je größer der Kalkgehalt des Blutes resp. Serums.

Es lag also auf der Hand die Frage zu studieren, ob der per os verabreichte Kalk beim Menschen nicht nur im Organismus retiniert wird, wie aus meinen Voruntersuchungen hervorging, sondern ob er auch den Kalkgehalt des menschlichen Blutes erhöht.

Wenn wir uns vergegenwärtigen, was bis jetzt über den Einfluß der Extrakalkgaben auf den Blutkalk bekannt ist, dann sehen wir, daß die Resultate der verschiedenen Untersucher nicht übereinstimmen. Diejenigen Autoren, die aus der Zu- oder Abnahme der Gerinnungszeit des Blutes nach Einverleibung von Kalk den Schluß gezogen haben, daß der Kalkgehalt des Blutes vermindert resp. erhöht war, haben damit eine der Kritik nicht standhaltende Schlußfolgerung gezogen,

---

[1]) Röse, Erdsalzarmut und Entartung. Deutsche Monatsschr. f. Zahnheilk. 1908, Heft 1 bis 6.

[2]) Hamburger und Hekma, diese Zeitschr. 9, 1908.

wie ich das in meiner ersten Mitteilung[1]) schon auseinandergesetzt habe.

Bemerken möchte ich nur, daß die verschiedenen Autoren auch auf die Gerinnungszeit nicht denselben Einfluß der Kalkzugabe sahen.

Während Wright[2]), Denk und Hellmann[3]), Weiß[4]), Chantemesse[5]), Luff[6]), Sabbattani[7]), Brown[8]) u. a. eine Abnahme der Gerinnungszeit fanden, verzeichnen Addis[9]), Meaute und Saissi[10]), Robertson, Illmann und Duncan[11]) u. a. keinen Einfluß.

Was nun die Bestimmungen des Blutkalkes selbst anbelangt, sind auch hier die Resultate verschieden: Wright[12]) nach seiner Methode, Blair Bell und Hick[13]) nach einer anderen, fanden Erhöhung des Kalkgehaltes; Neurath[14]) nach der Wrightschen Methode fand meist keinen Einfluß, bisweilen einen positiven, selten einen negativen. Bei einem Hunde fand er nach subcutaner Kalkinjektion eine Steigerung von 0,4 mg CaO pro 100 ccm Blut (chemisch bestimmt).

Loeper und Béchamp[15]) fanden, daß der Kalkgehalt des Blutes bei Gesunden wenig durch die Quantität Kalk der Nahrung beeinflußt wird, wohl aber bei einigen pathologischen Zuständen.

Hirschler und Terray[16]) fanden bei einem Patienten mit Endoarteritis chronica deformans bei gewöhnlicher Nahrung pro 100 ccm 5,1 mg CaO im Blute, bei kalkreicher Nahrung 2,3 mg (chemisch bestimmt). Eine bedeutende Abnahme also. Wie die Verfasser aber selbst bemerken, ist dieser Befund nicht beweisend, da der Blutkalk schon am

---

[1]) Voorhoeve, diese Zeitschr. 80, 1910.

[2]) Wright, Brit. med. Journ. 29. VII. 1893 und 14. VII. 1894; Lancet, 18. I. 1896 und 20. I. 1897.

[3]) Denk und Hellmann, Mitteilungen a. d. Grenzgeb. 20, Heft 2.

[4]) Weiß, Wiener klin. Wochenschr. 9. VI. 1910.

[5]) Chantemesse, Bull. méd. 1909, Nr. 21.

[6]) Luff, Brit. med. Journ. 30. I. 1909.

[7]) Sabbattani, Gazz. degli oped. 1909.

[8]) Brown, Sitzung der Aesculapian Society vom 6. XI. 1908.

[9]) Addis, Brit. med. Journ. 24. IV. 1909 und Quarterly Journ. of med. Jan. 1909.

[10]) Meaute und Saissi, Soc. de méd. de Paris 13. X. 1909.

[11]) Robertson, Illmann und Duncan, Journ. of americ. med. association 1, 1583.

[12]) Wright und Paramore, Lancet 14. X. 1905.

[13]) Blair Bell und Hick, Brit. med. Journ. Nr. 2513 bis 2517.

[14]) Neurath, Zeitschr. f. Kinderheilk. 1, Heft 1, 1910.

[15]) Loeper und Béchamp, Compt. rend. Soc. de méd. de Paris 16., 22. und 29. VII. 1910.

[16]) Hirschler und Terray, Zeitschr. f. klin. Med. 57, 1905.

ersten Tage der kalkreichen Nahrungsperiode bestimmt ist, und somit die Möglichkeit besteht, daß der Extrakalk noch nicht resorbiert war.

Rey[1]) fand beim Hunde (chemisch bestimmt) nach subcutanen und intravenösen Kalkgaben eine bedeutende Steigerung (von 10 auf 20 mg pro 100 ccm) des Blutkalkes bis 4 Tage nach einmaliger Injektion.

Außerdem wird nun noch von einigen derjenigen Autoren, die einen Einfluß der Extrakalkgabe auf den Kalkgehalt des Blutes oder auf die Gerinnungszeit verzeichnen, dieser Einfluß nur nach kleinen Kalkgaben für möglich gehalten, nicht aber nach Einverleibung großer Kalkdosen, so Blair Bell und Hick[2]), Weiß[3]), Chantemesse[4]).

Wir sehen, daß von Einigkeit keine Rede ist, und es war somit angezeigt, die Frage mit Hilfe einer zuverlässigen Methode nochmals zu untersuchen.

Zuerst müssen wir uns aber klar darüber werden, ob es theoretisch überhaupt möglich ist, den Kalkgehalt des Blutes zu ändern, hat doch bekanntlich das Blut eine sehr ausgesprochene Tendenz, seine Zusammensetzung so lange wie möglich konstant zu halten. Nur müssen wir diese Konstanz auffassen als eine innerhalb gewisser Grenzen schwankende. Wir wissen aber auch, daß unter gewissen pathologischen Bedingungen diese Grenze oft überschritten wird; man denke nur an den Zucker-, den Acidum uricum-, den Natrium chloratum-Gehalt des Blutes. Aber auch unter dem Einfluß der Nahrung kommen bei einem und demselben Tiere Schwankungen in der Blutzusammensetzung vor, worauf schon Liebig[5]) hingewiesen hat. So hat Padtberg[6]) nachgewiesen, daß bei Hunden nach 2 bis 3 Wochen chlorarmer Nahrung am Ende der Diät ein verminderter Chlorgehalt des Blutes besteht. Rey[1]) fand, wie schon oben erwähnt, mehrere Tage nach einer einmaligen Injektion von Kalk eine bedeutende Steigerung des Blutkalkes beim Hunde. So fand Biernacki[7]), daß bei Na-

---

[1]) Rey, Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. 35, 1895.

[2]) Blair Bell und Hick, l. c.

[3]) Weiß, Diskussion, Ärzte-Gesellschaft in Wien, referiert. Wiener klin. Wochenschr. 1910, Nr. 8.

[4]) Chantemesse, l. c.

[5]) Liebig, Chemische Briefe 1878, Brief 33.

[6]) Padtberg, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 63, Heft 1 und 2.

[7]) Biernacki, Zeitschr. f. klin. Med. 24, 1895.

Retention ein großes Quantum Na im Blute zirkulieren bleibt, und Allers und Bondi[1]), daß nach Säurevergiftung bei Kaninchen eine bedeutende Steigerung des Blutkalkes auftritt.

Wir können also a priori eine Beeinflußbarkeit des Blutkalkes für wahrscheinlich halten, und die Frage ist sogar sehr berechtigt, ob das Blut wohl imstande ist, trotz einer fortwährenden Überladung des Organismus mit Kalksalzen, seinen Kalkgehalt beizubehalten, und besonders auf die Dauer seinen früheren Kalkgehalt wieder herzustellen.

Für meine Bestimmungen habe ich absichtlich nur Männer gewählt, denn so brauchte ich mit eventuellen Störungen in der Nahrungsaufnahme oder im Stoffwechsel überhaupt, während der Menstruation, keine Rücksicht zu nehmen.

Die Bestimmungen wurden immer bei demselben Patienten zu gleicher Tageszeit gemacht, und zwar nachmittags von 3 bis 4 Uhr.

Nur solche Patienten, die schon mehrere Wochen im Krankenhause waren, und sich somit den neuen Verhältnissen (wie z. B. Nahrung usw.) angepaßt hatten, wurden untersucht.

Die Patienten änderten nichts an ihrer Lebensweise und wurden erst mehrere Tage kontrolliert, um festzustellen, ob sie spontan jeden Tag annähernd gleiche Quantitäten der verschiedenen Nahrungsmittel zu sich nahmen. War dies nicht der Fall, dann wurden sie nicht weiter untersucht. Soviel als möglich wurde die Art und der Kalkgehalt der Nahrung gleichgehalten, so daß die Schwankungen in den Quantitäten Kalk, in der Nahrung enthalten, niemals mehr als 300 mg pro Tag betrugen. Was die kalkreichen Nahrungsmittel betraf, so blieb das tägliche Quantum Milch und Butter konstant; an den Tagen, wo besonders kalkreiche Gemüse auf dem Speisezettel standen, wurden andere Gemüse gegeben. Die nicht kalkreichen Nahrungsmittel wurden nicht abgewogen, nur wurde darauf geachtet, daß die Patienten z. B. die Zahl ihrer Butterbrötchen, die Größe der Portionen Fleisch, Kartoffeln usw. nicht änderten.

Die quantitative Analyse, die öfters gemacht wurde, ergab, daß in dieser Weise für einen Patienten niemals ein Unterschied von 300 mg CaO in der Tagesnahrung bestand. Die Nahrung bestand aus viel Milch, entweder $1^1/_2$ oder 2 l (die Milch in den Milchspeisen enthalten ist hierbei mit gerechnet), Weiß- und Roggenbrot, Butter, Kaffee, Tee, Fleisch, Kartoffeln, Gemüse, Milchspeisen. Einige Patienten nahmen 1 oder 2 Eier täglich. Der CaO-Gehalt wechselte für die verschiedenen

[1]) Allers und Bondi, diese Zeitschr. 6, 1907.

Individuen zwischen 2800 und 4000 mg pro 24 Stunden und ist somit als ein hoher zu bezeichnen.

Ich erwähne dies absichtlich, denn es ist klar, daß die Extrakalkgabe cet. par. bei einem Menschen, der an Nahrung mit niedrigem Kalkgehalt gewöhnt ist, größeren Einfluß auf den Blutkalk haben kann, als bei einem Menschen, der gewöhnt ist schon in seiner Nahrung viel Kalk zu sich zu nehmen.

Um nun einen eventuellen Einfluß der Extrakalkgaben nachweisen zu können, mußte das Quantum viel größer als das Maximum der täglichen Schwankungen in dem Kalkgehalt der Nahrung sein. Ich gab 15 g Calc. lactic. in 250 g Aq. destill. gelöst in 3 Portionen innerhalb 24 Stunden zu nehmen. Jeden Tag wurde diese Lösung aufs neue bereitet. Die erste Portion bekamen die Patienten morgens um 7, die zweite um 11, die dritte nachmittags um 5 Uhr.

Es wurden somit 2727 mg CaO extra verabreicht, so daß die Patienten in der Kalkperiode fast das doppelte Quantum Kalk, das in der Vorperiode mit der Tagesnahrung einverleibt wurde, bekamen.

Unangenehme Nebenwirkungen habe ich niemals gesehen, Obstipation, die z. B. von Luff[1]) schon bei 3 g Calc. lact. d. d. beobachtet ist, sah ich niemals. Die Patienten nahmen das Getränk ohne jede Mühe.

Auch $CaCl_2$ wurde bisweilen gegeben, und zwar in einer Dosis, die 2727 mg CaO entsprach. Wegen seines unangenehmen, scharfen Geschmacks wurde dies von den Patienten aber ungern genommen. Nebenwirkungen waren auch hier nicht zu verzeichnen.

Schließlich habe ich auch kleine Kalkdosen gegeben, 3 g Calc. lactic. d. d.

Nachdem vor der Extrakalkgabe einige Bestimmungen gemacht waren, wurde, wenn der Blutkalkgehalt keine Schwankungen zeigte, der Extrakalk verabreicht und das Blut in dieser Periode wieder einige Male untersucht. Leider war es mir nicht möglich, in allen Fällen auch in der Nachperiode eine Bestimmung zu machen.

Die von mir untersuchten Personen waren also erwachsene oder fast erwachsene Männer, in Krankenhausverhältnissen lebend, die entweder das Bett hüteten oder herumliefen, die gewöhnliche Spitalkost bekamen mit hohem Kalkgehalt und jeden Tag gleich große Portionen der verschiedenenen Nahrungsmittel zu sich nahmen. Der maximale Unterschied in dem täglichen Nahrungskalk für denselben Patienten betrug 300 mg CaO. Leider fielen viele Patienten während der Beobachtung um irgendeiner Ursache wegen ab, so daß schließlich nur die zu Erwähnenden übrigblieben.

Die Kalkbestimmungen wurden nach der von mir in meiner ersten Mitteilung angegebenen Methode gemacht.[2]) Es konnten also Unterschiede bis auf $2^1/_2$ mg CaO pro 100 ccm

[1]) Luff, l. c.

[2]) Voorhoeve, l. c.

Tabelle 1.

Nr.	Alter	Diagnose	Blutkalkbestimmungen in der Vorperiode: Datum	Vorperiode: CaO pro 100 ccm Blut mg	Kalkperiode: Anfang	Kalkperiode: Extragabe	Kalkperiode: Datum	Kalkperiode: CaO pro 100 ccm Blut mg	Nachperiode: Anfang	Nachperiode: Datum	Nachperiode: CaO pro 100 ccm Blut mg	Bemerkungen
13	22 J.	Tuberc. pulmon., Stad. prim.	4. VI. 9. VI.	30 30	11. VI.	15 g C. lact. d. d.	16. VI. 23. VI. 30. VI.	35 32½ 35				Vom 31. V. bis 9. VI. Körpertemp. max. 38,0°, vom 9. VI. bis 16. VI. max. 37,1°. Körpergewicht vom 4. VI. bis 24. VI. um 1½ kg gestiegen, d. h. bis 76,1 kg.
54[1]	51 J.	Emphysema pulmon.	6. VI. 11. VI.	25 27½	15. VI.	7,46 $CaCl_2$ [1]) d. d.	28. VI. 4. VII.	30 27½				
37	35 J.	Diabetes mellitus.	7. VI. 11. VI.	25 25	15. VI.	7,46 $CaCl_2$ d. d.	20. VI. 24. VI. 1. VII.	30 30 30				Leichter Fall. Zuckerfrei während den Bestimmungen. Keine Diacetsäure oder Aceton. Bekommt tägl. 40 g Kohlenhydrate. Körpergew. vom 4. VI. bis 25. VI. um 2½ kg gestiegen, d. h. bis 62,0 kg.
26	59 J.	Emphysema pulmon.	24. XI. 29. XI.	32½ 32½	1. XII.	15 g C. lact. d. d.	2. XII. 7. XII. 27. XII.	35 40 40	5. I.	12. I.	37½	Körpergew. v. 12. XI. bis 31. XII. um 4 kg gestiegen, d. h. bis 60,0 kg.
34	20 J.	Ischias rheumat.	24. XI. 29. XI.	32½ 32½	1. XII.	15 g C. lact. d. d.	2. XII. 7. XII. 15. XII.	35 35 40	5. I.	12. I.	37½	
4	26 J.	Tuberc. pulmon. et laryng., Stad. tertium.	30. XI. 5. XII.	32½ 32½	9. XII.	15 g C. lact. d. d.	9. XII.	40	11. XII.	12. XII.	40	Temp. bis 39,0°. Vom 11. XI. bis 10. XII. um 3½ kg abgenommen, d. h. bis 55,6 kg. Das C. lact. reizt den Larynx u. löst Husten u. dadurch Erbrechen aus, darum bald aufgehört.
15	64 J.	Diabetes mell., Albuminuria. Arteriosclerosis gravior. Emphysema pulmonum.	2. VI. 7. VI. 13. VI.	27½ 27½ 30	15. VI.	7,46 $CaCl_2$ d. d.	20. VI. 23. VI. 28. VI.	32½ 30 32½				Vom 30. V. an Eiweißbeschränkg. u. 20 g Natr. bicarb. d. d. Am 2. VI. zuckerfrei. Aceton u. Diacetsäure negativ. Vom 4. VI. bis 25. VI. um ½ kg zugenommen, d. h. bis 57,0 kg.

3	73 J.	Diabetes mellitus. Alte Apoplexie.	3. VI. 9. VI.	30 30	11. VI.	15 g C. lact. d. d.	15. VI. 29. VI.	30 30	30. VI.			Vom 2. VI. ab nur Spuren Zucker, 15 g Natr. bic. d. d. Keine Kohlenhydrate. Aceton u. Diacetsäure negativ. Vom 11. VI. bis 30. VI. Durchfälle bis zu 7 mal tägl. Am 30. VI. entlassen. Vom 14. X. an Eiweißbeschränkg. 20 g Natr. bic. d. d. Keine Kohlenhydrate. Aceton u. Diacetsäure negat. Vom 4. XI. an zuckerfrei.
			14. X. 21. X.	30 30	8. XI. 13. XII.	3 g C. lact. d. d. 15 g C. lact. d. d.	9. XI. 21. XI. 14. XII.	35 35 35	30. XI.			
6	58 J.	Emphysema pulmon. et Tuberc. pulmon. fibrosa.	2. VI. 6. VI. 10. VI.	30 27½ 30	11. VI.	15 g C. lact. d. d.	15. VI. 27. VI. 7. VII. 12. VII. 25. VII.	35 35 30 30 30	15. VIII.	19. VIII.	30	
			14. X. 19. X.	30 30	2. XI.	3 g C. lact. d. d.	3. XI. 7. XI. 21. XI.	30 32½ 30	14. XII.			
					14. XII.	15 g C. lact. d. d.	14. XII. 22. XII.	32½ 35	24. XII.	13. I.	35	
54[II]	68 J.	Carcinom. viscerale occultum.	14. XI. 22. XI.	27½ 30	24. XI.	3 g C. lact. d. d.	25. XI.	30	12. XII.	13. XII.	27½	Immer etwas Blut bei den Faeces. Körpergew. vom 25. X. bis 16. XII. um 2 kg zugenommen, d. h. bis 53,8 kg.
					15. XII.	15 g C. lact. d. d.	15. XII 19. XII.	35 32½				
50[I]	19 J.	Bronchiektase.	15. XI. 22. XI. 13. XII.	37½ 35 37½	24. XI. 15. XII.	3 g C. lact. d. d. 15 g C. lact. d. d.	25. XI. 16. XII.	35 45 (wenigstens)	10. XII.	13. XII.	37½	
							19. XII. 22. XII.	55 45				
1	22 J.	Pneumothorax e causa ignota (Tuberculosis?)	13. IX. 19. IX. 26. IX.	30 30 30	28. IX.	3 g C. lact. d. d.	29. IX. 5. X. 10. X. 17. X. 21. X.	30 30 30 30 30				Vom 3. IX. bis 15. X. um 4½ kg zugenommen, d. h. bis 64 kg.

27*

[1]) Diese Dosis $CaCl_2$ mit Krystallwasser entspricht 2727 mg CaO; das Präparat wurde quantitativ analysiert, um seinen Wassergehalt zu bestimmen.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Alter	Diagnose	Blutkalkbestimmung in der Vorperiode: Datum	Vorperiode: CaO pro 100 ccm Blut mg	Kalkperiode: Anfang	Kalkperiode: Extragabe	Kalkperiode: Datum	Kalkperiode: CaO pro 100 ccm Blut mg	Nachperiode: Anfang	Nachperiode: Datum	Nachperiode: CaO pro 100 ccm Blut mg	Bemerkungen
33	40 J.	Traumat. Neurose, Aggravation.	14. IX. 20. IX. 26. IX.	30 27½ 30	28. IX.	3 g C. lact. d. d.	29. IX. 4. X. 10. X.	27½ 27½ 27½	11. X.	17. X.	30	Vom 8. IX. bis 15. X. um 1½ kg zugenommen, d. h. bis 60,6 kg.
51	70 J.	Lumbago.	15. IX. 21. IX. 27. IX. 30. IX.	25 25 25 25	5. X.	3 g C. lact. d. d.	6. X. 18. X.	25 25				Temperatur vom 18. IX. bis 18. X. bis zu 38,2° maximal.
35	45 J.	Tubercul. pulmon., Stad. secund.	15. IX. 21. IX 27. IX. 30. IX.	25 25 25 25	5. X.	3 g C. lact. d. d.	6. X. 18. X. 31. X.	25 25 25				Vom 7. IX. bis 14. X. um 3,5 kg zugenommen, d. h. bis 60,0 kg.
30	19 J.	Tuberc. apic., Stad. prim. Neurasthenia. Onanist.	23. IX.	25	27. IX.	3 g C. lact. d. d.	28. IX. 5. X.	25 25	8. X.	12. X. 19. X.	25 27½	Am 26. IX. entlassen, während der anderen Bestimmungen war Patient nicht im Krankenhause, über die Nahrung ist somit nichts Sicheres bekannt.
8	34 J.	Stenosis valv. mitral.	8. XI. 14. XI.	32½ 32½	16. XI.	3 g C. lact. d. d.	17. XI. 30. XI.	35 35				
50[II]	31 J.	Tubercul. pulmon., Stad. prim.—sec.	8. VII. 18. VII. 25. VII. 30. VII. 8. VIII. 26. X.	27½ 27½ 30 30 30 30	10. VIII. 27. X.	3 g C. lact. d. d. 3 g C. lact. d. d.	10. VIII. 12. VIII. 15. VIII. 16. VIII. 28. X.	30 27½ 27½ 27½ 35	1. IX.			Öfters Hämoptoe. Am 1. IX. entlassen. Die Bestimmungen im Oktober sind gemacht, ohne daß Patient im Krankenhause war: über die Nahrung ist somit nichts Sicheres bekannt.

Blut ausfindig gemacht werden, d. h. (das totale Blutquantum bei einem erwachsenen Manne auf 4 bis 5 l gestellt) Unterschiede von wenigstens 100 bis 125 mg CaO im Gesamtblute.

Bei meinen obenerwähnten Kalkbilanzbestimmungen hatte ich nun gefunden, daß bei großen Extrakalkgaben per os pro Tag 400 bis 1400 mg CaO mehr retiniert wurden als ohne Zulage. Diese Menge hatte also sicher das Blut passiert. Außerdem muß aber noch das unbekannte Quantum Kalk, das zwar resorbiert, aber innerhalb 24 Stunden wieder ausgeschieden war, hinzugezählt werden. Das Auftreten einer so bedeutenden Retention im Organismus ließ es möglich erscheinen, daß auch die Differenzen im Quantum Blutkalk groß genug sein würden, um mit dieser Methode nachgewiesen zu werden.

Was die Zahlen in der vorhergehenden Tabelle betrifft, bemerke ich ausdrücklich, daß sie keinen absoluten Wert haben und nur die eventuellen Unterschiede in Betracht zu ziehen sind. Für die Berechnung sehe man meine erste Mitteilung. Von den 2 Zahlen, zwischen denen der Blutkalkgehalt gefunden wurde, habe ich der Einfachheit wegen immer nur die niedrigere notiert.

Wir sehen aus diesen Tabellen, daß der Kalkgehalt des Blutes nicht immer in gleicher Weise beeinflußt wird.

Was die großen Kalkdosen anbelangt, so wurden diese an 11 Patienten verabreicht, darunter an 2 (Nr. 6 und Nr. 3) zweimal. In diesen 13 Versuchen wurde 12mal Vermehrung des Blutkalkes gefunden, 1mal blieb der Blutkalkgehalt konstant. In diesem letzten Falle aber (Patient Nr. 3, Periode am 11. VI. angefangen) bestanden starke Durchfälle, bis 7mal täglich, und es liegt auf der Hand, anzunehmen, daß diese Durchfälle die Ursache waren, weshalb eine Steigerung ausblieb. Am besten lassen wir diesen Fall denn auch außer Betracht, um so mehr, als der Patient später sowohl auf kleine als auf große Dosen positiv reagierte.

Was die Größe der Zunahme betrifft, so betrug sie pro 100 ccm Blut:

2 mal $2^1/_2$ mg (Nr. 54^I und 15),
5 „ 5 mg (Nr. 13, 37, 3 und Nr. 6 beide Male).
1 „ 5 bis $7^1/_2$ mg (Nr. 54^{II}),
3 „ $7^1/_2$ mg (Nr. 26, 34 und 4),
1 „ $17^1/_2$ mg (Nr. 50^I).

Rechnen wir mit der Tatsache, daß die Methode nur bis auf $2^1/_2$ mg pro 100 ccm genau ist, und betrachten wir deshalb die Zunahme mit nur $2^1/_2$ mg nicht als positive Reaktion, dann haben wir noch auf 12 Fälle 10 positive, oder, weil Nr. 6 2mal figuriert, bei 11 Patienten 9 positive Reaktionen.

Die kleinen Dosen wurden ebenfalls an 11 Patienten verabreicht (an Nr. 50^{II} zweimal). Von diesen 12 Versuchen müssen 2 ausgeschaltet werden (Nr. 30 und Nr. 50^{II} das zweitemal), weil die Patienten das Krankenhaus verlassen hatten und über ihre Nahrung deshalb keine Kontrolle mehr möglich war. Es bleiben also 10 Versuche an 10 Patienten übrig. Hierbei wurde 2mal eine Zunahme des Blutkalkgehaltes beobachtet (Nr. 3 und 8), und zwar 1mal mit 5 mg pro 100 ccm (Nr. 3), 1mal mit $2^1/_2$ mg (Nr. 8); außerdem 1mal eine fragliche Zunahme (Nr. 6). Rechnen wir auch hier die Zunahme mit $2^1/_2$ mg sicherheitshalber nicht als positiv, dann finden wir auf 10 Versuche 1mal ein positives Resultat.

Bemerken muß ich aber, daß das Quantum Kalk in der Nahrung nicht absolut konstant war, und daß diese Inkonstanz bei den kleineren Extragaben einen viel größeren Einfluß hat als bei den größeren. Nehmen wir z. B. an, daß eine Bestimmung in der Vorperiode an einem Tage gemacht ist, wo 300 mg CaO mehr in der Nahrung waren, als bei einer Bestimmung in der Kalkperiode, dann ist der Unterschied des einverleibten Kalkes an diesen Tagen $545 - 300 = 245$ mg CaO (545 mg ist die als 3 g Calc. lact. verabreichte Extragabe). Ist dagegen der Kalkgehalt der Nahrung in der Vorperiode am Tage der Bestimmung 300 mg CaO weniger als am Tage der Bestimmung in der Kalkperiode gewesen, dann hat der Unterschied $545 + 300 = 845$ mg CaO betragen. Wir haben hier somit mit Extragaben, die von 245 bis zu 845 mg CaO pro Tag schwanken können, zu tun.

Um zu sehen, ob wirklich die größere Kalkdosis die Ursache des Unterschiedes in der Reaktion beider Gruppen war, und nicht etwa in der zweiten Gruppe zufälligerweise sich viele Patienten befanden, die überhaupt wenig auf Kalk reagierten, wurden mehrere Patienten sowohl mit großen als mit kleinen Dosen untersucht.

Folgende Tabelle gibt die Resultate:

Nr.	Kleine Dose	Reaktion	Große Dose	Reaktion
6	1×	fraglich	2×	positiv (+ 5)
50 I	1×	keine	1×	„ (+ $17^1/_2$)
54 II	1×	„	1×	„ (+ 5 bis $7^1/_2$)
3 (das 2. Mal)	1×	positiv (+ 5)	1×	„ (+ 5)

Von den 4 Patienten reagierten also alle positiv auf große Dosen, während auf kleine nur einer positiv reagierte, einer zweifelhaft und zwei nicht.

Hieraus geht hervor, daß durch große Kalkdosen der Blutkalkgehalt bedeutend gesteigert werden kann, daß aber bei kleinen Kalkdosen eine Zunahme des Blutkalkes von mehr als $2^1/_2$ mg pro 100 ccm zu den Ausnahmen gehört.

Über die Dauer der positiven Reaktion gibt folgende Tabelle, in der nur diejenigen Fälle untergebracht sind, die länger als 10 Tage nach Anfang der Kalkperiode untersucht sind, einen Überblick.

Nr.	Zahl der Tage nach Anfang der Kalkperiode	Reaktion	Dauer der Kalkperiode	Zahl der Tage nach Anfang der Nachperiode	Reaktion	Totale Dauer der positiven Reaktion = x
			Große Dosen.			
13	19	+	19	—	—	$x \geqq 19$
54 I	13	zweifelhaft +	19	—	—	$13 < x < 19$
54 I	19	0				
26	26	+	35	7	+	$x \geqq 42$
34	14	+	35	7	+	$x \geqq 42$
15	13	+	13	—	—	$x \geqq 13$
6	16	+	26	—	—	$16 < x < 26$
6	26	0				
6	8	+	10	19	+	$x \geqq 29$
			Kleine Dosen.			
3	13	+	13	—	—	$x \geqq 13$
8	14	+	14	—	—	$x \geqq 14$

Ich bedaure sehr, nicht in der Lage gewesen zu sein, bei allen Patienten Bestimmungen in der Nachperiode anzustellen, und besonders auch nicht die Gelegenheit gehabt zu haben, die Patienten zu beobachten, bis die positive Reaktion geschwunden war, um so die Dauer dieser Reaktion festzustellen; es war aber leider nicht möglich, die Patienten länger im Spital zu halten.

Nur 2mal wurde das Schwinden einer positiven Reaktion beobachtet (Nr. 54[I] und Nr. 6), das eine Mal nach 19, das andere Mal nach 26 Tagen. Merkwürdigerweise beide Male noch während der Kalkperiode.

Von den 3 Patienten, die in der Nachperiode untersucht wurden, reagierten alle 3 noch positiv, einer sogar noch am 19. Tage. Wir können deshalb sagen, daß es möglich ist, den Blutkalk durch Extrakalkgaben wochenlang zu erhöhen, und daß auch nach Aussetzung der Extragaben eine Erhöhung des Blutkalkgehaltes fortdauern kann.

Einen Unterschied in dem Effekt der Calc. lact.- und $CaCl_2$-Lösung konnte nicht konstatiert werden.

Für die Beantwortung der Frage, ob der Kalkgehalt des Blutes und die Stärke der Reaktion auf Extrakalkgaben vom Alter abhängig ist, oder ob gewisse Krankheiten diese beiden Faktoren beeinflussen, sind meine Beobachtungen zu wenig zahlreich. Jedenfalls besteht in meinen Fällen in dieser Beziehung kein eklatanter Unterschied.

Eine deutliche Abnahme des Blutkalkgehaltes während der Kalkperiode, wie sie von einigen Autoren beobachtet oder theoretisch postuliert ist, konnte ich niemals feststellen.

Vergleiche ich meine Resultate mit denen Neuraths[1]), dann ist es nicht zu verwundern, daß dieser Autor im allgemeinen keinen Einfluß seiner Extrakalkgaben auf das Quantum Blutkalk verzeichnen konnte, denn wenn Neurath bei 9 bis 14 Jahren alten Kindern 1 bis 2 g einer $2^1/_2$ %igen $CaCl_2$-Lösung subcutan einspritzt, dann werden (wenn wir annehmen, daß das Quantum $CaCl_2$ ohne Krystallwasser berechnet ist, im anderen Falle würde das einverleibte Kalkquantum noch kleiner sein) 12,5 bis 25 mg CaO in den Organismus gebracht. Stellt man das Blutquantum bei diesen Kindern auf 2 l[2]), und nimmt man an, daß alles einverleibte CaO in das Blut kommt (was sicher nicht der Fall ist), dann wäre also eine Zunahme von 0,6 bis 1,2 mg CaO pro 100 ccm Blut zu erwarten. Daß diese kleinen Unterschiede nach der Wrightschen Methode mit Lösungen von Ammon-

[1]) Neurath, l. c.

[2]) Siehe die Untersuchungen von Müller: Jahrb. f. Kinderheilk. 72, Ergänzungsheft.

oxalat in einer Stärke von $^1/_{600}$, $^1/_{900}$, $^1/_{1200}$ usw. nicht wieder gefunden worden sind, ist nicht zu verwundern. Denn eine einfache Berechnung[1]) lehrt, daß die kleinsten Differenzen im Kalkgehalt des Blutes, die durch die hier benützten Oxalat-Lösungen ausfindig gemacht werden können, pro 100 ccm Blut betragen: zwischen $^1/_{600}$ und $^1/_{900}$ 22 mg, zwischen $^1/_{900}$ und $^1/_{1200}$ 11 mg und weiter resp. 6,6 und 4,6 mg.

Auch wenn Neurath 2 bis 3 g Calc. lact. per os verabreicht, d. h. 364 bis 545 mg CaO, kann wieder unter Annahme, daß 2 l Blut vorhanden sind und alle extra Kalkgaben in das Blut kommen, höchstens eine Steigerung von 18 bis 27 mg CaO pro 100 ccm Blut gefunden werden. Wenn aber schon ohne Kalkzugaben die Differenzen bei demselben Individuum an aufeinanderfolgenden Tagen 18, sogar 22 mg CaO pro 100 ccm Blut betragen ($^1/_{900}$ und $^1/_{1500}$ nach Wright bei Patient Kraus; $^1/_{900}$ und $^1/_{1800}$ bei Brdicka), dann scheint es mir kaum möglich in diesen Fällen und nach dieser Methode überhaupt einen Einfluß der Kalkgaben festzustellen.

Neurath weist übrigens mit vollem Recht mehrmals darauf hin, daß absolute Zahlen nach einer Methode, wobei der Kalk mit Oxalsäure ausgefällt wird, nicht zu erwarten sind. Daß aber die chemische Analyse höhere Werte gibt als die andere, kann ich nicht zugeben. Den Beweis bringen die Zahlen Neuraths. Nach Wright findet er bei einem Hunde noch Gerinnung des Blutes bei Mischung mit einer Ammonoxalatlösung von $^1/_{1500}$, nicht mehr bei $^1/_{1200}$, d. h. einen CaO-Gehalt zwischen 26 und 33 mg pro 100 ccm; chemisch bestimmt findet er aber nur 6,75 mg CaO, nach Kalkeinverleibung nach Wright zwischen 33 und 44 mg, chemisch aber nur 7,18 mg.

Damit will ich Neurath nicht entgegentreten, wenn er sagt, daß mit Oxalsäure nur der lose und nicht der organisch gebundene Kalk ausgefällt wird, ist dies ja die Meinung der

[1]) Mol.-Gew. CaO = 56, Ammonoxalat = 124 (Ammon. oxal. cryst., das mit 1 Mol. H_2O krystallisiert = 142). In Lösungen von $^1/_{600}$, $^1/_{900}$ usw. bis $^1/_{1800}$ befinden sich resp. 166,6; 111,1; 83,3; 66,6; 55,5 mg.

1 Mol. Ammonoxalat bindet 1 Mol. CaO,

oder 142 mg „ „ 56 mg „

166,6 „ „ „ $\frac{56 \times 166{,}6}{142} = 65{,}7$

111,1 „ „ „ $\frac{56 \times 111{,}1}{142} = 43{,}8$ usw.

meisten Untersucher, obgleich z. B. Osborne[1]) diese Auffassung nicht teilt. Nur möchte ich darauf hinweisen, daß die chemische Analyse viel niedrigere Werte ergibt als die durch Oxalsäurefällung gefundene. Und es fragt sich, wem dieser Unterschied zu danken ist. Die Ursache liegt m. E. in beiden Methoden.

Erstens gibt die chemische Analyse so genau wie möglich quantitativ den Kalkgehalt des Blutes. Man braucht aber nur den sehr auseinandergehenden Zahlen, auch den in neuerer Zeit gefundenen, nachzugehen, um sich durch Hamburger[2]) zur Vorsicht mahnen zu lassen, und zu zweifeln, ob in einer so großen Quantität Blut, wie sie bei der chemischen Analyse verarbeitet werden muß, die minimalen Quantitäten Kalk nach den jetzt geübten Methoden sämtlich zurückgefunden werden können.

Zweitens aber ist die Ausfällung des Kalkes mit Oxalsäure keine quantitative Methode, sie zeigt nur Differenzen bis zu einem gewissen Minimum an.

Es spielen bei dieser Methode zu viele Faktoren mit, die es unmöglich machen, nach ihr den genauen absoluten Kalkgehalt zu ermitteln. Gruppieren wir diese Faktoren (und es gibt gewiß noch mehrere als die hier angeführten), dann sehen wir, daß

der Kalkgehalt

zu hoch gefunden wird dadurch daß:	zu niedrig gefunden wird dadurch daß:
der zum Oxalatblut hinzugefügte Kalk teilweise ungebunden bleibt, bevor alle Oxalsäure, die sie nach der chemischen Formel mit Kalk hätte binden können, dies getan hat. (Siehe die betreffenden Experimente in meiner ersten Mitteilung.[3])	1. der organisch fest gebundene Kalk ev. nicht durch Oxalsäure ausgefällt wird; 2. das Minimum CaO, das für die Gerinnung notwendig ist, unbekannt ist; 3. der Einfluß der Oxalsäure auf die Fermentwirkung[4]) schädlich ist.

Außerdem besteht dann noch bei meiner Methode eine Fehlergrenze von $2^1/_2$ mg pro 100 ccm, die die Folge der Unterschiede in der Stärke der gebrauchten $CaCl_2$-Lösungen ist.

[1]) Osborne, Journ. of Physiol. 27.

[2]) Hamburger, Zeitschr. f. phys. Chem. 69.

[3]) Voorhoeve, l. c.

[4]) Siehe Hammarsten, Lehrbuch d. physiol. Chem.

Der obengenannte Faktor, der einen zu hohen absoluten Kalkwert gibt, ist nun m. E. sehr bedeutend und übertrifft alle anderen zusammen. Wie dem aber auch sei, zu quantitativen Kalkbestimmungen ist die Methode durchaus ungeeignet, und sie soll nur zum Ausfindigmachen von Differenzen im Kalkgehalte benutzt werden.

Wenn ich zusammenfasse, geht aus diesen Untersuchungen folgendes hervor:

Durch die Einverleibung von 2727 mg CaO per os pro Tag, entweder als Calc. lact. oder als $CaCl_2$, kann der Blutkalkgehalt bei erwachsenen und fast erwachsenen Männern, bei einer kalkreichen Diät, um ein bedeutendes gesteigert werden. Bei einer Extragabe von 545 mg CaO pro Tag ist unter gleichen Bedingungen wie oben die Steigerung des Blutkalkes in den meisten Fällen weniger als $2^1/_2$ mg pro 100 ccm, resp. nicht vorhanden.

Die Steigerung des Blutkalkes kann wochenlang andauern und auch in der Nachperiode fortbestehen. Ein nachteiliger Einfluß von großen Extrakalkgaben wurde nicht konstatiert.

Eine Abnahme des Blutkalkgehaltes nach Extrakalkgaben konnte nicht nachgewiesen werden.

Beobachtungen über die Maltase des Blutserums und der Leber.

Von

Leonidas Doxiades.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 12. April 1911.)

Mit 4 Figuren im Text.

Nach den Versuchen von Chosaburō Kusumoto[1]) zeigt sowohl das Blutserum wie der Leberextrakt verschiedener Tiere in bezug auf die Geschwindigkeit, mit der zugesetzte Maltose gespalten wird, regelmäßige, für die betreffende Tierart eigentümliche Unterschiede. So war z. B. die Maltasewirkung des Blutserums beim Hammel stets bei weitem schwächer als beim Schwein.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. F. Röhmann wurden diese Versuche von Herrn cand. med. S. Helischkowski wieder aufgenommen und von mir weitergeführt. Die von ersterem herrührenden Versuche finden im folgenden Erwähnung.

Durch die Versuche sollte festgestellt werden, ob die von Ch. Kusumoto beobachteten Unterschiede auf einem verschiedenen Enzymgehalt der Sera beruhen oder ob neben dem Enzym Hemmungsstoffe in verschiedener Menge vorhanden sind, die den Unterschied erklären könnten; des weiteren, ob das Serum und der Leberextrakt neben einem Maltase spaltenden Enzym auch ein Enzym enthält, das Traubenzuckermoleküle etwa nach Art der Hefemaltase zu neuen rechtsdrehenden Kohlenhydraten vereinigt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 14, 217, 1908.

I. Einfluß der Neutralisation und Erwärmung auf die Maltasewirkung des Blutserums und des Leberextraktes.

Von den Bedingungen, die die Wirkung der Maltase beeinflussen können, kommen nach anderweitigen, bekannten Erfahrungen in erster Linie zwei in Betracht: die Reaktion und die Temperatur.

In der Tat ließ sich feststellen, daß nach Zusatz einer bestimmten Menge von Säure die Spaltung der Maltose durch das Blutserum zunimmt. Es ließ sich weiter zeigen, daß durch Erwärmen auf 50° die Maltasewirkung herabgesetzt wird. Erwärmt man aber das vorher mit der entsprechenden Menge Säure „neutralisierte" Serum, so ist die Maltasewirkung noch stärker als bei alleiniger Neutralisation.

Dasselbe Verhalten zeigt auch die Maltasewirkung von Leberextrakten.

In dem Blutserum und dem Leberextrakt sind also Stoffe enthalten, die die Wirkung der Maltase hemmen. Durch Erwärmen des neutralisierten Serums bzw. Leberextraktes auf 50° C wird die Hemmungswirkung beseitigt. Man kann die hemmenden Stoffe, dem üblichen Sprachgebrauch folgend, als Antimaltase bezeichnen. Vielleicht handelt es sich um einen kolloiden, schwach basischen Körper, der an die Maltase chemisch gebunden ist und durch die vereinte Wirkung von Säure und Wärme von ihr getrennt wird.

Versuche.

Das Blutserum stammte von Blut, das spontan geronnen war. Es wurde zentrifugiert und mit dem entsprechenden Antiseptikum versetzt.

Die Lebern wurden von der Pfortader aus mit 0,8%iger Kochsalzlösung durchspült. Dann wurden sie in der Reibschale fein zerrieben und mit so viel einer 1%igen Fluornatriumlösung übergossen, daß das Volumen von Leberbrei und Lösung $^1/_{10}$ des Körpergewichtes betrug. Der Brei wurde durch Leinwand gepreßt; die abgepreßte Flüssigkeit wurde zentrifugiert.

Die Spaltung der Maltose wurde nur polarimetrisch verfolgt. Ebenso wie in den Versuchen von Ch. Kusumoto wurden 5 ccm des Serums bzw. 15 ccm des Leberextraktes mit 5 ccm einer 10%igen Maltoselösung und 25 ccm einer warmgesättigten 25%igen alkoholischen Zinkacetatlösung versetzt und auf 50 ccm aufgefüllt. Das Filtrat wurde im 2-dcm-Rohr untersucht. Beim Leberextrakt wurde die Eigen-

drehung und eine etwaige Änderung von ihr, die beim Stehen in der Wärme eintrat, berücksichtigt.

Als Antiseptikum benutzte Helischkowski Toluol. Ich selbst ging zu Fluornatrium über, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß dieses die Maltase weniger beeinträchtigt als andere Antiseptika. Auf 100 ccm Blutserum bzw. Leberextrakt wurden 1 g FNa zugesetzt.

Als Beleg führe ich den folgenden Versuch an: 5 ccm Blutserum vom Schwein wurden mit 3 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure und mit 5 ccm etwa 10%iger Maltoselösung versetzt, unter Zusatz von: a) 1% Fluornatrium, b) von einigen Tropfen einer 10%igen alkoholischen Thymollösung, c) von Chloroform, d) von Toluol.

Nach 5 Stunden wurden die verschiedenen Proben nach obigem Verfahren untersucht. Es betrug der Drehungswinkel bei

a) Fluornatrium . .	0° 54′	c) Chloroform . . .	1° 24′
b) Thymol	1° 18′	d) Toluol	1° 30′

Die folgenden Versuche von Helischkowski zeigen, daß durch Zusatz einer gewissen Menge von Säure die Maltasewirkung gesteigert, durch eine größere Menge von Säure herabgesetzt wird.

Es wurden je 5 ccm Blutserum vom Schwein und Hammel mit einer etwa $^n/_{10}$-Schwefelsäure unter Anwendung von rotem Lakmoidpapier titriert. Hierbei ergab sich, daß das Schweineserum stärker alkalisch reagierte als das Hammelblutserum. Für ersteres waren zur „Neutralisation" 4 ccm, für letzteres 3 ccm erforderlich. Das spezifische Gewicht beider Sera war beiläufig bemerkt gleich groß. Es betrug 1,029.

Auf Grund dieser Titrierung wurden vom Schweine- und Hammelserum je 4 Proben aufgestellt. Eine Probe enthielt 5 ccm Serum und 5 ccm der 10%igen Maltoselösung und Toluol ohne Säure, der zweiten Probe waren noch 2 ccm, der dritten 3 ccm, der vierten 4 ccm, der $^1/_{10}$-Schwefelsäure zugesetzt. Das Schweineserum wurde nach 5 Stunden, das Hammelserum nach 48 Stunden untersucht. Es wurden die folgenden Drehungswinkel beobachtet.

	Schweineserum nach 5 Std.	Hammelserum nach 48 Std.
5 ccm Serum ohne Säure	2° 8′	2° 39′
5 „ „ 2 ccm $^1/_{10}$ H_2SO_4 . .	1° 49′	2° 39′
5 „ „ 3 „ „ . .	1° 42′	2° 24′
5 „ „ 4 „ „ . .	1° 53′	2° 31′

Das Hammelserum wirkte nur sehr wenig auf die Maltose ein. Durch Säurezusatz wurde die Wirkung nur sehr wenig gesteigert.

In den folgenden Versuchen Helischkowskis wurden die Sera in einem Wasserbade bis auf 50° C erhitzt und im Strahl der Wasserleitung schnell abgekühlt. Dann wurde die

Wirkung des erwärmten Serums mit der des nicht erwärmten verglichen.

	Nicht erwärmt	Erwärmt
	α	α
Schweineserum zu Beginn des Versuchs	2° 53′	—
„ nach 6 Stunden . . .	2° 0′	2° 14′
Hammelserum zu Beginn des Versuchs	2° 52′	—
„ nach 24 Stunden . . .	2° 27′	2° 44′

Durch Erwärmen auf 50° wird also die Wirkung des nicht neutralisierten Serums wenig, aber deutlich herabgesetzt.

Ich selbst konnte diese Beobachtungen von Helischkowski bestätigen und dahin erweitern, daß Erwärmung des vorher neutralisierten Serums die Maltasewirkung nicht abschwächt, sondern noch über die Wirkung des neutralisierten Serums hinaus steigert.

Um die Wirkung der Neutralisation und Erwärmung recht deutlich hervortreten zu lassen, wurden von jedem Serum gleichzeitig 4 Proben aufgestellt: a) Serum unbehandelt, b) Serum mit $^1/_{10}$-Normal-Salzsäure, für rotes Lakmoidpapier annähernd neutralisiert, c) Serum 2 Stunden auf ca. 50° C erwärmt, d) Serum mit $^1/_{10}$-Normal-Salzsäure neutralisiert und erwärmt.

Je 5 ccm des betreffenden Serums wurden wieder mit 5 ccm der 10%igen Maltoselösung versetzt. Dann wurde nach 5 und 15 Stunden das Drehungsvermögen bestimmt. Auf den folgenden Tafeln finden sich die erhaltenen Werte in ein Koordinatensystem eingetragen, in denen die Abszissen die Stunden, die Koordinaten die beobachteten Drehungswinkel angeben.

Aus den Kurven ersieht man zunächst wieder in Übereinstimmung mit Ch. Kusumoto, daß die Sera der verschiedenen Tiere die Maltose mit verschiedener Geschwindigkeit zerlegen. Sie zeigen ferner, daß Erwärmung des nicht neutralisierten Serums die Maltase beeinträchtigt, daß Neutralisation die Wirkung befördert und daß Neutralisation und Erwärmung die Spaltung der Maltose durch das Serum ganz außerordentlich beschleunigt. Hierbei bleiben aber die Unterschiede zwischen den verschiedenen Serumarten erhalten.

Durch stärkeres Erhitzen wurde die Maltase in allen Fällen zerstört.

Dieselbe Wirkung von Wärme und Säure zeigte sich auch bei der Untersuchung des Leberextraktes in den zwei folgenden Versuchen.

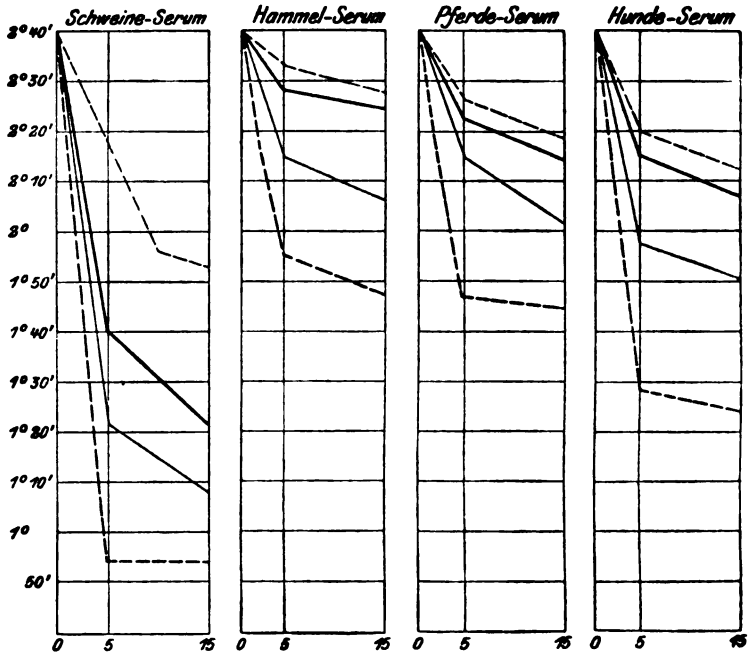


Fig. 1.

Serum
„ erwärmt und neutralisiert.
„ neutralisiert.
„ erwärmt.

Ein Kaninchen A hungerte 2 Tage, ein anderes B wurde mit kohlenhydratreicher Nahrung gefüttert. Beide wurden aus der Carotis entblutet. Die Leber wurde von der Pfortader durchspült und in der obenerwähnten Weise extrahiert. Die Leber des Kaninchens A war fast glykogenfrei, die des Kaninchens B glykogenreich.

Ein Vergleich zwischen Kaninchen A und B läßt einen deutlichen Unterschied hervortreten insofern, als sowohl das Blutserum wie der Leberextrakt bei dem gefütterten Kaninchen die Maltose stärker spaltete als bei dem hungernden. Ob dieser Unterschied ein regelmäßiger ist, soll durch weitere Versuche festgestellt werden. Das vollkommene Übereinstimmen

im Verhalten der Maltase des Blutserums und des Leberextraktes kann als ein weiterer Beweis für die von F. Röhmann und seinen Schülern vertretene Identität der kohlenhydratspaltenden Enzyme von Blut und Leber betrachtet werden.

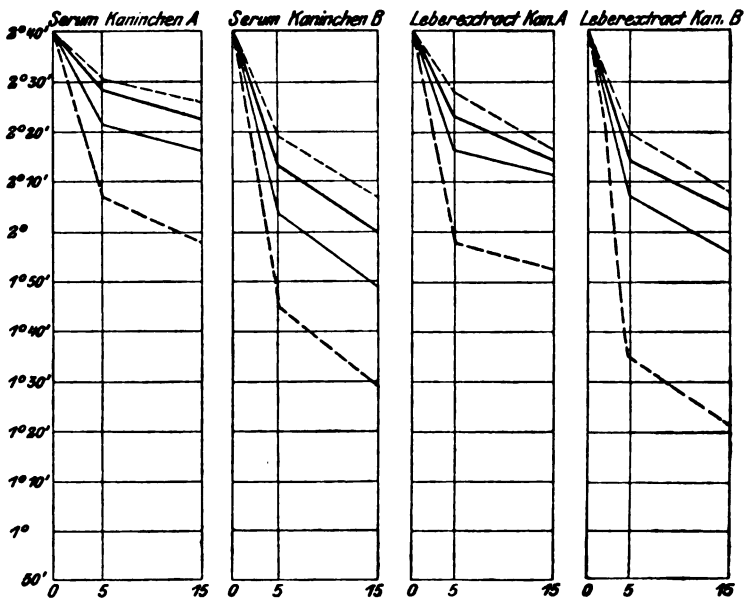


Fig. 2.

II. Über eine Reversionswirkung des Blutserums.

Wenn die angeführten Versuche beweisen, daß durch Erwärmung bei Gegenwart von Säure die Hemmungswirkung gewisser Stoffe im Serum beseitigt wird, ohne daß die Unterschiede verschwinden, welche die Sera verschiedener Tiere in bezug auf die Maltosespaltung zeigen, so konnte man geneigt sein daraus zu schließen, daß der Maltasegehalt der verschiedenen Sera ein verschiedener ist. Dieser Schluß ist aber nicht einwandsfrei. Die Spaltung der Maltose wurde nur mit Hilfe der Polarisation verfolgt. Es wäre denkbar, daß neben dem maltosespaltenden Enzym ein Ferment im Blutserum vorhanden ist, das Glucosemoleküle zu neuen optisch-aktiven Molekülen vereinigte. Eine solche Annahme lag besonders nahe im Hinblick auf die bekannten Versuche von A. Croft Hill, der zuerst gezeigt hat, daß Hefeextrakte zu solchen Kondensationen befähigt sind.

Die folgenden Beobachtungen scheinen zu beweisen, daß in der Tat auch das Blutserum eine ähnliche Fähigkeit besitzt. Ich verfüge bisher erst über die folgenden zwei Versuchsreihen.

In der Reihe I (Fig. 3) wurden in einem 50-ccm-Kölbchen etwa 10 g reiner feinpulverisierter Traubenzucker (Kahlbaum) mit Blutserum vom Schwein übergossen und das Kölbchen bis zur Marke mit dem Serum, das 1% Fluornatrium enthielt, aufgefüllt. In der Reihe II (Fig. 4) wurde eine entsprechende Lösung mit etwa 15 g Traubenzucker hergestellt.

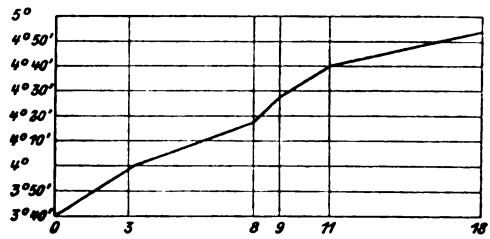


Fig. 3.

Die Lösungen wurden in fest verschlossenen Gefäßen in einen auf etwa 34° C regulierten Wärmeschrank gestellt.

Von Zeit zu Zeit wurden Proben von 5 ccm entnommen, die in einem 25-ccm-Kölbchen mit 5 ccm alkoholischer Zinkacetatlösung versetzt und mit Alkohol bis zur Marke aufgefüllt wurden. Es wurde filtriert und im 2-dcm-Rohr polarisiert. Die gefundenen Werte finden sich auf den folgenden Kurven verzeichnet, auf denen die Abszissen Tage, die Koordinaten die beobachteten Drehungswinkel bedeuten.

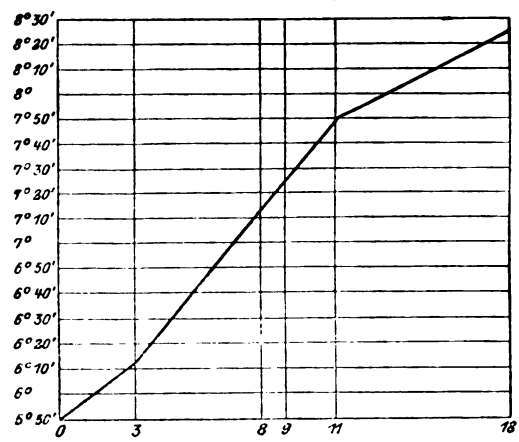


Fig. 4.

In beiden Versuchsreihen, und zwar sowohl in derjenigen, in der das Serum mit 20% Traubenzucker versetzt war, noch mehr in der Reihe mit 30% Traubenzucker nahm das Drehungsvermögen stetig zu.

Weitere Beobachtungen behalte ich mir vor.

Untersuchungen über Diastasen.

I. Mitteilung.

Von

Ivar Bang.

(Aus dem med.-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 13. April 1911.)

Mit 5 Figuren im Text.

Nach den recht zahlreichen Untersuchungen über Diastasen — und besonders Ptyalin — und deren Beeinflussung durch Neutralsalze sollte man denken, daß Studien hierüber nicht besonders lohnend wären. Vertieft man sich aber in diese Probleme, so wird man wie gewöhnlich bemerken, daß neue Perspektiven sich eröffnen. Diese neuen Fragestellungen sind jedoch hier nur in einigen Richtungen verfolgt worden, da diese Studien hauptsächlich nur eine Vorarbeit zur Erforschung der Zuckerbildung in der Leber darstellen. Die Untersuchungen hierüber aber sollen erst in einer folgenden Abhandlung mitgeteilt werden. (Sie sind noch nicht abgeschlossen.)

Methodik.

Als Diastase wurde überall Ptyalin verwendet, und zwar das filtrierte Saliv. Öfters wurde sie dialysiert (Dialysierhülsen von Schleicher & Schüll). Das Substrat war Mercks lösliche Stärke als 1%ige Lösung. Hierbei zeigte es sich notwendig, überall bei jeder Versuchsserie die Wirkung des Ptyalins allein auf die Stärkelösung zu kontrollieren. Eine frisch dargestellte oder gleich aufgekochte (und wieder abgekühlte) Stärkelösung wurde zwar reichlich fermentiert; aber schon nach dem Stehen der Stärkelösung während 12 bis 24 Stunden

war die Zuckerbildung durch Ptyalin bedeutend geringer, was mit dem Alter der Stärkelösung immer mehr hervortrat. Z. B. lieferten 10 ccm Stärkelösung 3 Tage alt mit 0,1 ccm Saliv nur 9,9 mg Dextrose, während dieselbe Lösung aufgekocht und wieder abgekühlt mit derselben Salivmenge 26,4 mg Dextrose ergab. Die Ursache dieser Erscheinung ist wahrscheinlich, daß die Stärke nach und nach wieder ausgeschieden wird, trotzdem ein Niederschlag nicht zu bemerken ist. Denn die nicht gelöste Stärke wird überhaupt nicht von dem Saliv angegriffen. Z. B. lieferten 0,150 g Stärkepulver mit 10 ccm H_2O, 0,1 ccm 1%iges NaCl und 0,5 ccm Saliv gemischt nach einer Digestion von 2 Stunden bei 18° nur 1 mg Dextrose, während ein Bruchteil dieser Salivmenge mit 10 ccm Stärkelösung nach 1 Stunde 39 mg Dextrose lieferte. Bekanntlich hat schon Hammarsten gefunden, daß fein zerriebene Reis-, Kartoffel- u. a. Stärkearten von Ptyalin verzuckert werden. Diese Mercksche Stärke von mir unbekanntem Ursprung verhält sich also in dieser Beziehung anders. (Sie stellt auch ein feines Pulver dar.) Die Stärkelösungen wurden in der Weise dargestellt, daß das abgewogene, in etwas Wasser aufgeschwemmte Stärkepulver in kochendes Wasser gegossen wurde. Nach dem Kochen, 2 bis 3 Minuten, wurde die Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt. Außerdem wurden 1%ige Glykogenlösungen verwendet. Die Versuche wurden überall bei Zimmertemperatur, ca. 18° C, angestellt. Die Digestionszeit war überall 1 Stunde.

Die Diastasewirkung wurde durch Titration nach meiner Reduktionsmethode bestimmt und die gefundene Reduktion als Dextrose berechnet.

Die Ergebnisse mit Stärkelösungen sollen zuerst besprochen werden, später wird von den Glykogenlösungen die Rede sein.

I.

Aus den übereinstimmenden Untersuchungen von mehreren Forschern [betreffs Literatur vgl. Starkenstein[1])] geht hervor, daß sowohl Speichel, wie Blut-, Leber- und Pankreasdiastasen durch Dialyse inaktiviert, auf Zusatz von Kochsalz aber jedoch wieder reaktiviert werden können.

[1]) Starkenstein, diese Zeitschr. 24, 210, 1910.

Meine Untersuchungen haben dies für das Ptyalin nicht ganz bestätigen können. Nach der Dialyse war zwar die Wirkung des Ptyalins immer mehr oder weniger herabgesetzt, dagegen ist es mir niemals gelungen eine vollständige Inaktivierung zu erzielen. Vielleicht wird dies dadurch verursacht, daß meine Reduktionsmethode so geringe Zuckermengen (bzw. reduzierende Dextrine) zu entdecken und bestimmen erlaubt, die z. B. durch die Jodmethode nach Wohlgemuth einfach übersehen werden. Selbst wenn die Jodreaktion noch rein blau wird, reduziert die Lösung sowohl Fehling wie meine Kupferlösung, was ich reichlich zu beobachten Gelegenheit habe.

Da also meine Beobachtungen nicht mit den früheren übereinstimmen, habe ich noch 3 verschiedene Methoden festzustellen versucht, inwieweit die löslichen Salze in casu NaCl für die Wirkung des Ptyalins prinzipiell notwendig sind oder nicht.

A. Dialyse.

Versuch Nr. 1. 20 ccm filtriertes Saliv wurden 3×24 Stunden gegen $3 \times 2{,}5$ l dest. Wasser dialysiert (Saliv a). Eine Probe desselben Saliv als Kontrolle aufbewahrt (Saliv b). Hier wie überall Toluol als Antiseptikum zugesetzt. 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv a = 22,7 mg D.; 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv b = 34,3 mg D. Die Wirkung ist also etwas, obwohl nicht viel, herabgesetzt worden.

Eine Probe des mit HNO_3 angesäuerten dialysierten Saliv gab mit $AgNO_3$ keinen Niederschlag oder bemerkbare Opalescenz. (Die Salpetersäure allein bewirkte eine schwache Opalescenz, die absolut nicht durch $AgNO_3$ vermehrt wurde.) Nun ist es denkbar, daß die Kolloide eine Chlorreaktion verhindert haben. Um so mehr beweisend ist deswegen der folgende Versuch.

Versuch Nr. 2. Den 20. III. 1911 wurden 2 ccm Saliv gegen 2,5 l dest. Wasser dialysiert und das Wasser jeden Tag erneuert. Etwas Saliv als Kontrolle aufbewahrt.

Tabelle I.

Datum	Dialysiertes Saliv (0,1 ccm + 10 ccm St.) mg D.	Nicht dialys. Saliv (0,1 ccm + 10 ccm St.) mg D.
21. III. 1911	13,4	31,4
22. „ „	11,5	32,2
23. „ „	15,4	32,6

Hier wurde das Saliv gegen die 1000fache Wassermenge 3mal dialysiert. Nach 24 Stunden ist die Wirkung bis auf $^1/_3$

gesunken, bleibt aber später auf diesem Punkt unverändert stehen. (Die Differenzen sind durch die verschiedenen Stärkelösungen bedingt.)

B. Alkoholbehandlung.

Da das Ptyalin mit unveränderten Eigenschaften durch Alkohol niedergeschlagen werden kann, während NaCl in dem wässerigen Alkohol bleibt (und hier kommen doch nur sehr geringe NaCl-Mengen vor), läßt sich hierdurch eine Trennung der beiden bewirken.

Versuch Nr. 1. 7 ccm Saliv wurden mit 2 Vol. Alkohol versetzt und nach 2 Stunden filtriert, der Niederschlag gut ausgepreßt und in 7 ccm H_2O gelöst und filtriert (Saliv a). Saliv b = Kontrolle.

10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv a = 27,7 mg D.
10 „ „ + 0,1 „ „ b = 30,2 „ „

Versuch Nr. 2. 6 ccm Saliv mit Alkohol niedergeschlagen, in Wasser gelöst und aufs neue mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag in 6 ccm H_2O gelöst. 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv = 21,7 mg D. Das Saliv wurde schließlich 24 Stunden dialysiert. Jetzt wurden 19,8 mg D. gefunden.

Also bewirkt auch eine Trennung mit Alkohol keine Inaktivierung der Diastase. Und selbst Alkoholbehandlung + Dialyse können das Ptyalin nicht inaktivieren.

C. Adsorption durch Stärke.

Wie anfangs bemerkt, wird die nicht gelöste Stärke Mercks vom Ptyalin angegriffen. Andererseits hat Starkenstein gezeigt, daß die Leberdiastase durch Stärkepulver aus einer Lösung entfernt werden kann. Nach Starkenstein geschieht dies auch, wenn die Lösung lösliche Stärke enthält. Beim Ptyalin verhält sich aber die Sache anders. Zwar wird auch hier die Diastase durch Stärkepulver aus der wässerigen Lösung entfernt. Setzt man aber zu dem ausgewaschenen Stärkepulver eine Stärkelösung hinzu, so geht Ptyalin in Lösung und bewirkt Hydrolyse.

Versuch Nr. 1. 0,5 g filtriertes Saliv mit ca. 0,150 g Stärkepulver und 4 × 30 ccm H_2O versetzt (das Wasser jedesmal durch Zentrifugierung entfernt). Das Pulver schließlich mit 10 ccm Stärkelösung versetzt, 13,2 mg D. gefunden.

Versuch Nr. 2. Wie Versuch Nr. 1, doch wurde die Stärkelösung unmittelbar nach Mischung mit dem Stärkepulver abzentrifugiert, 17,0 mg D.

Versuch Nr. 3. Wie Versuch Nr. 1, doch wurde das Stärkepulver schließlich mit 10 ccm Wasser versetzt, und dies nach Filtration mit 10 ccm Stärkelösung versetzt. Nach 3 Stunden schwach positive Reduktion (qualitativ).

Es bleibt also offen, inwieweit eine Dissoziation des adsorbierten Ptyalins oder eine chemische Bindung durch das Stärkepulver vorkommt. Was hier interessiert, ist aber, daß nach 4maligem Auswaschen mit Wasser das Ptyalin fortwährend aktiv bleibt.

Aus diesen sämtlichen Versuchen geht also hervor, daß das Ptyalin nach Entfernung des NaCl aktiv bleibt, obwohl seine Wirkung mehr oder weniger herabgesetzt worden ist.

II.

Dagegen habe ich die reaktivierende Wirkung des NaCl durchaus bestätigen können, weshalb ich mich hierüber ganz kurz fassen kann. Das größte Interesse zeigen hier die quantitativen Verhältnisse.

Versuch Nr. 1. Das in der Tabelle I erwähnte Saliv zeigte ohne Zusatz von NaCl 11,5 mg D., nach Zusatz von 0,1 ccm 1%igem NaCl aber 35,1 mg. Trotzdem die Stärkelösung nur 1:10000 NaCl enthält, ist also die Wirkung des Ptyalins mehr als 3mal größer geworden und übersteigt sogar die des nicht dialysierten Saliv (32,2 mg). In einem anderen Versuch (Nr. 2) tritt die eminente Wirkung ganz geringer NaCl-Mengen noch schärfer hervor.

Versuch Nr. 2. 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm dialysiertes Saliv = 12,7 mg D. Dieselbe Mischung + NaCl bis 1:100000 = 24,3 mg, 1:10000 = 29,1 mg und 1:1000 = 28,5 mg. Die maximale NaCl-Wirkung ist also beinahe schon bei 1:100000 NaCl erreicht worden, was auch besonders durch den folgenden Versuch Nr. 3 bestätigt wurde.

Tabelle II.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	H_2O ccm	NaCl ccm	NaCl absolut	Gebildete Dextrose mg
10	0,1	0,5	—	—	18,0
10	0,1	0,4	0,1‰	1:100000	32,0
10	0,1	0,3	0,2 „	1:50000	33,4
10	0,1	0,2	0,3 „	1:33000	34,2
10	0,1	—	0,5 „	1:20000	34,5
10	0,1	0,4	0,1%	1:10000	34,6

Das Saliv war dasselbe wie in Versuch Nr. 1.

Die graphische Darstellung in Fig. 1 bietet einen guten Überblick über diese Verhältnisse.

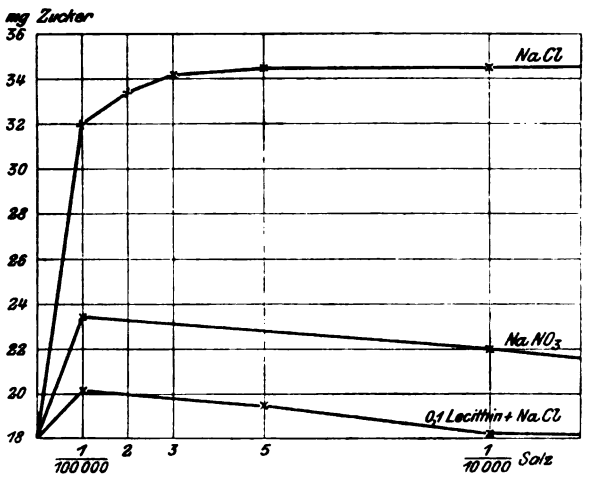


Fig. 1.

Das Optimum der NaCl-Wirkung liegt also bei etwa 1:33000 oder entspricht bei dem gegebenen Speichelgehalt einer NaCl-Konzentration des Speichels von ca. 0,5‰. Nun ist zwar der physiologische NaCl-Gehalt des Speichels recht variabel, indessen liegen die Werte doch zwischen 0,5‰ und 2‰. Also kann man aus den obigen Versuchen die Folgerung ziehen, daß der Speichel ungefähr den NaCl-Gehalt besitzt, der dem Optimum der Aktivierung entspricht. Infolgedessen kann man durch NaCl-Zusatz zu dem natürlichen Speichel die Diastasewirkung nur unwesentlich verstärken. Dies verhält sich alles nur so bei den oben angegebenen Versuchsbedingungen. Wie sich die Sache bei anderen Proportionen von Speichel und Stärke verhält, ist nicht untersucht worden. Doch dürften wohl im großen und ganzen die Folgerungen einem allgemeinen Gesetz entsprechen.

Es fragt sich dann weiter, wie sich die Diastase bei noch größerer NaCl-Konzentration verhält. Tabelle III enthält einige Versuche hierüber.

Der Speichel war frisch und filtriert.

Sogar bei Gegenwart von 6,5% NaCl ist der Speichel also ziemlich unverändert wirksam und erst bei 13% NaCl ist

eine nicht sehr bedeutende Verminderung der Ptyalinwirkung zu bemerken. Ja, eine Sättigung der Stärkelösung mit NaCl vermag noch nicht die Ptyalinwirkung völlig zu verhindern (0,10 g Stärke in 10 ccm 26% NaCl-Lösung gelöst, bei Zimmertemperatur abgekühlt und mit 0,1 ccm Saliv versetzt = 8,5 mg Dextrose. Man bemerke, daß der Stärkegehalt hier doppelt so groß wie in den obigen Versuchen ist!). Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden früherer Forscher gut überein.

Tabelle III.

Stärkelösung ccm	H_2O ccm	26% NaCl-Lösung ccm	Saliv ccm	NaCl-Gehalt der Lösung	Gebildeter Zucker mg
5	5	—	0,1	—	15,5
5	4	1	0,1	2,6:100	16,5
5	2,5	2,5	0,1	6,5:100	14,9
5	—	5	0,1	13,0:100	11,4

Nach Wohlgemuth u. a. ist das Cl-Ion für die Aktivierung verantwortlich. Dies läßt sich nach Wohlgemuth u. a. daraus folgern, daß z. B. $CaCl_2$, nicht aber andere Na-Salze das NaCl zu ersetzen vermögen. Auch diese Folgerung trifft zu. Die $CaCl_2$-Versuche stimmen mit den NaCl-Versuchen gut überein, wenn man den Cl-Gehalt berücksichtigt. Diese Versuche brauchen nicht näher erwähnt zu werden.

Dagegen bieten Versuche mit $NaNO_3$ und Na_2SO_4 etwas mehr Interesse dar und verdienen eine kurze Berücksichtigung.

$NaNO_3$-Versuche.

Tabelle IV.

Stärkelösung ccm	H_2O ccm	Saliv ccm	$NaNO_3$ ccm	$NaNO_3$ %	$NaNO_3$-Gehalt der Lösung	Gebildeter Zucker mg
10	0,5	0,1	—		—	18,0
10	0,4	0,1	0,1	0,15	1,5:100000	23,5
10	0,4	0,1	0,1	1,5	1,5:10000	21,9
10	0,4	0,1	0,1	15	1,5:1000	18,4

1,5 $NaNO_3$ entspricht 1,0 NaCl. Diese Versuche wurden zur selben Zeit und mit demselben Saliv wie die NaCl-Versuche Tabelle II ausgeführt.

Wie ersichtlich, bewirkt jedoch $NaNO_3$ 1,5:100000 eine geringe, aber deutliche Aktivierung des Ptyalins, die jedoch weit geringer als die NaCl-Wirkung ist (23,5 mg bis 32,0 mg bzw. + 5,5 mg und + 14,0 mg). Vermehrt man den $NaNO_3$-Gehalt bis 1:10000, so ist die Wirkung schon geringer, während dieselbe beim NaCl noch weiter emporsteigt, und bei 1,5:1000 ist $NaNO_3$ schon ganz indifferent (vgl. auch Fig. 1).

Na_2SO_4-Versuche.

Tabelle V.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	Na_2SO_4-Lösung ccm	Na_2SO_4 der Lösung	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	—	—	12,4
10	0,1	0,1 $^n/_{100}$	1,42:100000	11,9
10	0,1	0,1 $^n/_{10}$	1,42:10000	12,9
10	0,1	0,1 $^n/_1$	1,42:1000	15,4

Der Speichel war dialysiert und ca. 8 Tage alt. 1 NaCl entspricht 2,5 Na_2SO_4 (ohne Krystallwasser berechnet).

Auch das Na_2SO_4 übt also unter Umständen eine aktivierende Wirkung aus. Während aber NaCl und $NaNO_3$ schon bei sehr geringer Konzentration die optimale Wirkung erreichen, findet das Entgegengesetzte beim Na_2SO_4 statt, indem hier erst bei ca. 1:500 eine Aktivierung zu finden ist. Daß der Speichel nicht unwirksam geworden war, zeigten einige $CaCl_2$-Versuche (0,1 ccm $^n/_{100}$-$CaCl_2$ mit 0,1 ccm Saliv und 10 ccm Stärkelösung zeigte 27,7 mg Zucker).

III.

Sehr interessante Ergebnisse haben die Phosphatversuche geliefert, die deswegen hier ausführlicher behandelt werden sollen.

Nach Roger[1]) sollen Phosphate für die Ptyalinwirkung unentbehrlich sein. Sonst ist hierüber nichts bekannt.

Hier sollen ausschließlich Alkaliphosphate erwähnt werden, und zwar sowohl Di- wie Mononatriumphosphat.

A. Dinatriumphosphat. $Na_2HPO_4 + 12\,H_2O$ wurde als $^n/_1$, $^n/_{10}$ und $^n/_{100}$-Lösungen verwendet. Diese Lösungen ent-

[1]) Zit. nach Oppenheimer, Fermente. Spez. Teil. 3. Aufl. 1910. S. 95.

halten 348 g, 34,8 und 3,58 g Salz pro Liter oder ohne Berücksichtigung des Krystallwassers 1,42 g usw.

Von meinen recht zahlreichen Versuchen führe ich folgende an:

Tabelle VI.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	Na_2HPO_4 ccm	Phosphat-Gehalt der Lösung	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	—	—	12,7
10	0,1	0,1 $^n/_{100}$	1,4:100000	7,8
10	0,1	0,1 $^n/_{10}$	1,4:10000	2,7
10	0,1	0,1 $^n/_1$	1,4:1000	0,9
10	0,1	—	—	25,0
10	0,1	0,1 $^n/_{100}$	1,4:100000	12,7
10	0,1	0,1 $^n/_{10}$	1,4:10000	3,3
10	0,1	0,1 $^n/_1$	1,4:1000	0

Aus der Tabelle VI geht die bemerkenswerte Tatsache hervor, daß das dialysierte Saliv schon durch ganz minimale Mengen Natriumphosphat stark beeinträchtigt wird und daß weiter eine noch verhältnismäßig unbedeutende Phosphatquantität die Ptyalinwirkung völlig aufzuheben vermag.

Man muß sich fragen, inwieweit das Salz die Diastase zerstört hat oder ob nicht vielmehr die Wirkung nur verhindert wird. Im letzteren Falle wäre die Diastase also nur inaktiviert. Die letzte Alternative ist entschieden die wahrscheinlichste, da es undenkbar ist, daß z. B. ein Phosphatgehalt 1:10000 das Ptyalin zerstören sollte. Wenn es aber zutreffend wäre, dürfte man vielleicht durch Entfernung des Salzes die Diastase wieder reaktivieren können. Dies läßt sich auf verschiedene Weise realisieren. Erstens durch Dialyse.

Versuch Nr. 1. 5 ccm filtriertes, nicht dialysiertes Saliv wird mit 0,5 ccm 36% $Na_2HPO_4 + 12\,H_2O$ versetzt. Eine Probe dialysiert (a), der Rest als Kontrolle (b) aufbewahrt. Das Dialysat (ca. 2,5 l) jeden Tag entfernt. Nach 24 Stunden: 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm a-Saliv = 4,1 mg Zucker. 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm b-Saliv = 14,6 mg. Nach 3 Tagen. a-Saliv = 4,3 mg. b-Saliv = 14,5 mg. Der ursprüngliche Speichel ohne Phosphat ergab 31,4 mg D.

Versuch Nr. 2. 2 ccm filtriertes Saliv mit 0,1 ccm 36% $Na_2HPO_4 + 12\,H_2O$ versetzt. 1,2 ccm dialysiert (a), der Rest als Kontrolle (b) aufbewahrt. Nach 24 Stunden a-Saliv = 2,4 mg und b-Saliv = 13,4 mg.

Das Ergebnis dieser Versuche ist, daß die Wirkung des Phosphats durch Dialyse noch größer wird, obwohl sicher

durch Dialyse gegen 3×2,5 l dest. H_2O das zugesetzte Phosphat vollständig entfernt worden ist.

Die zweite Methode stellt die Adsorption durch Stärkepulver dar.

Versuch Nr. 1. 0,5 ccm Speichel (nicht dialysiert) + 1 ccm 36% Na_2HPO_4 + 12 H_2O mit ca. 0,150 g Stärkepulver wurden einen Augenblick leise geschüttelt, mit 4×25 ccm H_2O zentrifugiert und das Pulver schließlich mit 10 ccm Stärkelösung versetzt. 6,7 mg D. und 8,5 mg D. gefunden.

Die Kontrollen ohne Phosphat ergaben 13,2 mg D. und 17,0 mg D.

Nicht also die Gegenwart des Phosphats, sondern gewisse durch das Phosphat bedingte Änderungen sind für den Effekt bestimmend.

Vergleicht man die Wirkung des Phosphats bei dialysiertem (Tabelle VI) und nicht dialysiertem Speichel, so ist ersichtlich, daß sie beim dialysierten Speichel viel größer ist (2,7 mg und 3,3 mg gegen 6,7 mg und 8,5 mg). Der Unterschied in beiden Fällen beruht nur auf dem Gehalt an Kochsalz. Es fragt sich also, inwieweit das Kochsalz, das beim dialysierten Speichel ein Aktivator ist, auch bei der Inaktivierung durch Phosphat eine Rolle spielen kann. Im letzteren Falle müssen selbstverständlich die durch das Phosphat bedingten Änderungen reversibel sein. Die folgende Tabelle kann hierüber unterrichten.

Tabelle VII.

Stärkelösung ccm	Dialys. Saliv ccm	36% Na_2HPO_4 + 12 H_2O ccm	NaCl-Lösung ccm	NaCl-Lösung %	H_2O ccm	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	0,1	—		0,5	3,5
10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	19,2
10	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	24,2
10	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	26,7
10	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	28,8
10	0,1	0,1	0,5	0,1	—	30,2
10	0,1	0,1	0,1	1	0,4	31,9
10	0,1	—	0,1	1	0,5	31,4

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in Fig. 2 zusammengestellt.

Aus den Versuchen geht ganz überzeugend hervor, daß ein Zusatz von NaCl die Wirkung des Phosphats aufzuheben vermag.

Hierzu genügen sogar ganz geringe NaCl-Mengen. Durch Vergleich der Fig. 1 und 2 geht die vollständige Übereinstimmung beider hervor, trotzdem der Anfang der Kurve bei den Phosphatversuchen viel niedriger liegt (3,5 mg gegen 18,0 mg).

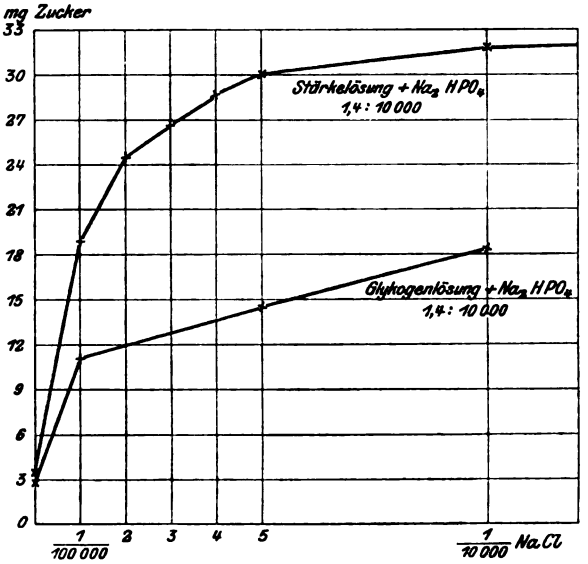


Fig. 2.

Recht illustrierend sind auch die folgenden Versuche.

Tabelle VIII.

Nr.	Stärkelösung ccm	Dialysiertes Saliv ccm	$Na_2HPO_4 + 12H_2O$ ccm	$Na_2HPO_4 + 12H_2O$ %	NaCl-Lösung ccm	NaCl-Lösung %	Gebildeter Zucker mg
1	10	0,1	—	—	—	—	12,7
2	10	0,1	—	—	0,1	0,1	24,3
3	10	0,1	—	—	0,1	1	29,1
4	10	0,1	—	—	0,1	10	28,5
5	10	0,1	0,1	3,6	—	—	2,7
6	10	0,1	0,1	3,6	0,1	0,1	12,1
7	10	0,1	0,1	3,6	0,1	1	23,0
8	10	0,1	0,1	3,6	0,1	10	27,9
9	10	0,1	0,1	3,6	—	—	0,9
10	10	0,1	0,1	3,6	0,1	0,1	4,5
11	10	0,1	0,1	3,6	0,1	1	11,8
12	10	0,1	0,1	3,6	0,1	10	13,4

Sogar bei Gegenwart von 3,6‰ Phosphat, das so gut wie vollständig die Zuckerbildung verhindert, vermag NaCl eine

Zuckerbildung auszulösen, die etwas größer als die durch den Speichel allein ist. Besonders interessant ist ferner Versuch Nr. 6, wo bei Gegenwart von 0,36‰ Phosphat durch 1:10000 NaCl die ursprüngliche Diastasewirkung erreicht wird.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Ptyalin nicht durch das Phosphat zerstört wird. Dagegen wird seine Wirkung verhindert, d. h. es wird inaktiviert, und zwar viel ausgiebiger als durch Dialyse allein. Es ist auch ganz klar, daß die Reaktion der Lösung, d. h. die Ionenkonzentration der Lösung nicht hierfür bestimmend sein kann. Denn erstens wird doch diese Konzentration durch Zusatz von so geringen NaCl-Mengen wie z. B. 1:10000 kaum verändert und zweitens haben wir oben gesehen, daß die Verminderung der Diastasewirkung noch viel stärker hervortritt, wenn man das Phosphat wieder durch Dialyse entfernt. (Dies letzte Verfahren ist überhaupt die schnellste und wirksamste Methode, um den Speichel zu inaktivieren.) Es bleibt also nichts übrig als anzunehmen, daß das Phosphat gewisse, aber reversible Änderungen des aktiven Ptyalinmoleküls bewirkt hat. (Daß das Phosphat die Stärke verändern sollte, braucht wohl kaum erörtert zu werden.) Und die einzige Erklärung, die die Reaktivierung durch NaCl und den Gegensatz zwischen Phosphat und Chlorid überhaupt verständlich machen kann, ist, daß das aktive Ptyalinmolekül mit NaCl eine dissoziable Verbindung bildet. Bei der Dialyse wird ein Teil des NaCl abdissoziiert und entfernt, der Rest wird aber energisch von dem Ptyalinmolekül zurückgehalten und dialysiert nicht gleich fort. Setzt man aber überschüssiges Natriumphosphat hinzu, so setzt sich dieses größtenteils mit dem Chlorid um und es entsteht eine inaktive Ptyalin-Phosphatverbindung. Solange sich aber noch NaCl in der Lösung befindet, kann es trotz eines Überschusses von Phosphat zum Teil erfolgreich damit konkurrieren, weil die Affinität des Ptyalins zum NaCl größer ist als zum Phosphat; z. B. hat in Versuch Nr. 6, Tabelle VIII, 1:100000 NaCl die Wirkung von 3,6:10000 $Na_2HPO_4 . 12H_2O$ aufgehoben. 1 Teil NaCl entspricht hier etwa 10 bis 15 Teilen Phosphat (vom Krystallwasser abgesehen). Wird aber das freigemachte NaCl gleich durch Dialyse entfernt, so muß immer mehr und mehr NaCl fortdissoziiert werden, bis ein praktisch NaCl-freies Ptyalinmolekül schließlich

entstanden ist. Hiermit sind die Dialyseversuche mit Phosphat erklärt worden.

Eine andere Tatsache spricht auch für diese Hypothese, die übrigens schon von Starkenstein angedeutet worden ist. Wird der dialysierte, noch etwas aktive Speichel einige Tage aufbewahrt, so sinkt mit der Zeit das diastatische Vermögen, um während einer folgenden Dialyse schnell, beinahe vollständig zu verschwinden.

Recht hübsch werden diese Verhältnisse durch folgende Versuche illustriert. Zuerst sei daran erinnert, daß eine Fällung mit Alkohol auf frischen Speichel wirkungslos ist (27,7 mg gegen 30,2 mg gefunden).

Ein etwa 14 Tage altes, dialysiertes Saliv (a) ergab 13,2 mg D. 2 ccm des Speichels mit Alkohol niedergeschlagen, zentrifugiert und der Rückstand in 2 ccm H_2O gelöst (b). 8,3 mg D. oder 5 mg weniger gefunden. Jetzt wurden beide Proben mit NaCl 1:10000 (auf Stärkelösung wie gewöhnlich berechnet) versetzt. a-Saliv 28,8 mg, b-Saliv 25,9 mg. Sowohl die absoluten wie besonders die relativen Werte sind durch die Alkoholbehandlung stark herabgesetzt worden, durch Zusatz von NaCl werden die Unterschiede — besonders relativ — ausgeglichen.

Sowohl das dialysierte wie das nicht dialysierte Saliv zeigen beim Stehen eine langsame Abnahme der Diastasewirkung, die jedoch schneller beim dialysierten Speichel vonstatten geht. Durch Zusatz von NaCl wird der Speichel überall regeneriert.

Wenn aber die oben entwickelte Auffassung richtig sein soll, muß auch ein durch Phosphat schon inaktiviertes Saliv durch NaCl wieder reaktiviert werden können. Bei den bis jetzt erwähnten Versuchen sind nämlich Phosphat und Chlorid zur selben Zeit zugesetzt worden.

Versuch Nr. 1. 2 ccm nicht dialysiertes (und also NaCl-haltiges) Saliv wurden mit 0,1 ccm 36% $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ versetzt. 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm dieses Speichels = 13,4 mg D. Nach Dialyse, 24 Stunden, wurden gefunden 2,4 mg D. Derselbe dialysierte Speichel mit 0,1 ccm 1% NaCl versetzt ergab aber 28,3 mg D. Die Kontrolle (Saliv ohne Phosphat) = 31,4 mg D.

Versuch Nr. 2. 1. 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm 36% $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ + 0,1 ccm dialysiertes Saliv = 2,7 mg D. 2. Dieselbe Mischung + 0,1 ccm 1% NaCl = 23,0 mg. 3. Dieselbe Mischung ohne NaCl 1 Stunde gestanden, dann 0,1 ccm 1% NaCl zugesetzt = 28,4 mg D. (Selbstverständlich muß 3. mehr Zucker als 2. enthalten, da doch in der ersten Stunde etwas Zucker gebildet worden ist.)

Versuch Nr. 3. 0,5 ccm Saliv mit der doppelten Menge 36% $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ versetzt. Nach einigen Sekunden wurde die Mischung mit 0,15 g Stärkepulver geschüttelt, 4mal ausgewaschen und das Residuum mit 10 ccm Stärkelösung versetzt = 6,7 mg D. (also ist trotz des großen Phosphatüberschusses etwas NaCl an dem Ptyalin geblieben). Eine ähnliche Probe nachher mit 0,1 ccm 1% NaCl versetzt = 39,0 mg D.

Ich kann also der Auffassung von Wohlgemuth, Starkenstein u. a. beistimmen, daß das Ptyalin nach Entfernung von NaCl inaktiv wird. Dagegen glaube ich oben erwiesen zu haben, daß eine Dialyse hier nicht zum Ziele führt, weil ein Teil des NaCl hartnäckig zurückgehalten wird. Weiter kann ich gern zugeben, daß die mit dialysiertem Saliv digerierte Stärke oft eine positive Jodreaktion gibt. Trotzdem aber die Farbe blau oder violett ist, reduzieren die Lösungen sowohl meine Kupferlösung wie Fehlingsche nicht unerheblich.

B. Mononatriumphosphat. $NaH_2PO_4 + H_2O$ wurde ebenfalls als $^n/_1$, $^n/_{10}$ und $^n/_{100}$-Lösung verwendet. Diese Lösungen enthalten 138, 13,8 und 0,138 g Salz pro Liter oder ohne Berücksichtigung des Krystallwassers 120 g usw.

Das Monophosphat verhält sich in mehreren Beziehungen vom Dinatriumphosphat verschieden. Zwar bewirkt auch das Monophosphat eine Hemmung der Diastasewirkung, die beim größeren Phosphatgehalt ebenso stark hervortritt wie beim Dinatriumphosphat. Bei geringerer Phosphatmenge 1,38 : 100000 oder 10000 ist aber die Hemmung nur unbedeutend, ja unter gewissen Bedingungen bemerkt man hier die entgegengesetzte aktivierende Wirkung. Schließlich läßt sich die Hemmung des Monophosphats nicht durch Zusatz von NaCl überwinden, wohl aber in anderer Weise.

Die folgenden Parallelversuche mit dialysiertem Speichel illustrieren die Wirkungen der beiden Phosphate (überall 10 ccm Stärkelösung und 0,1 ccm Saliv).

Tabelle IX.

0,1 ccm von	Mononatriumphosphat. mg D gebildet.	Dinatriumphosphat. mg D gebildet.
—	25,0	25,0
$^n/_{100}$	23,5	12,7
$^n/_{10}$	18,4	3,3
$^n/_1$	1,5	0

Wie aus der Tabelle IX und Fig. 3 hervorgeht, ist die Wirkung von Monophosphat bei den Konzentrationen 1,2:100000 bis 1,2:10000 nur ganz gering und steht im Gegensatz zu der Wirkung des sekundären Phosphats, das schon bei 1,3:100000 stark hemmt. Dagegen findet man bei der Konzentration 1:1000 sowohl für primäres wie sekundäres Phosphat eine vollständige Hemmung der Diastasewirkung.

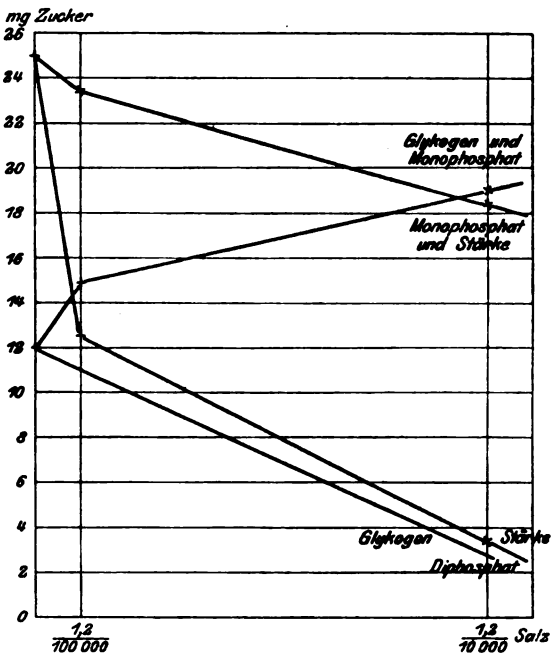


Fig. 3.

In zwei anderen Versuchen mit dialysiertem Speichel wurde ebenfalls schon durch 1,2:10000 primäres Phosphat eine geringe Hemmung gefunden (4,1 mg gegen 8,1 mg und 7,3 mg gegen 8,3 mg). In einem dritten Versuch mit nicht dialysiertem Speichel (8 Tage alt) war dieselbe Phosphatquantität indifferent (27,5 bis 26,9 mg), auch nach Zusatz von NaCl 1:10000 (32,6 bis 33,0 mg). Man kann also wohl sagen, daß diese Phosphatquantitäten durchschnittlich ziemlich indifferent sind (eine eventuelle Wirkung ist wohl von dem variablen Alkalicarbonatgehalt des Speichels abhängig).

Fragen wir jetzt nach der Wirkung des primären Phosphats auf dem durch Dinatriumphosphat und Dialyse NaCl-frei gemachten Speichel, so findet man hier eine unzweifelhaft fördernde Wirkung.

Versuch Nr. 1. 0,5 g Saliv mit 1 ccm 36% $Na_2HPO_4 . 12H_2O$ und 0,15 g Stärkepulver digeriert, 4mal mit Wasser (25 ccm) ausgewaschen und schließlich mit 10 ccm Stärkelösung digeriert; gefunden 8,5 mg D., mit 0,1 ccm 1,4% $NaH_2PO_4 + H_2O$ aber 13,9 mg und mit 0,1 ccm 1% NaCl 39 mg.

Versuch Nr. 2. 0,1 ccm dialysiertes Saliv ergab 8,1 mg D., mit 0,1 ccm 1,4% Monophosphat aber 11,9 mg und mit 0,1 ccm 1% NaCl 28,1 mg.

Versuch Nr. 3. 2 ccm Saliv + 0,1 ccm 36% $Na_2HPO_4 . 12H_2O$. 1,2 ccm gegen $2 \times 2{,}5$ l H_2O während 2 Tagen dialysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle X zusammengestellt.

Tabelle X.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	NaCl-Lösung 1% ccm	NaCl-Lösung 1% %	NaH_2PO_4-Lösung 14% ccm	NaH_2PO_4-Lösung 14% %	Phosphatgehalt der Lösung	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	—	—	—	—	—	4,7
10	0,1	0,1	1	—	—	—	28,3
10	0,1	—	—	0,1	1,4	1,2 : 100000	21,6
10	0,1	—	—	0,1	1,4	1,2 : 10000	19,3
10	0,1	—	—	0,1	1,4	1,2 : 1000	3,1

Aus den obigen Versuchen ist ersichtlich, daß ein durch Behandlung mit sekundärem Phosphat NaCl-frei gemachtes Ptyalin durch ganz geringe Mengen primäres Phosphat reaktiviert werden kann, wenn das sekundäre Phosphat schon durch Dialyse entfernt worden ist. Die reaktivierende Wirkung des Monophosphats ist nicht immer sehr viel geringer als die des Kochsalzes. Die Folgerung liegt am nächsten, daß eine aktive Phosphorsäure-Ptyalinverbindung entstanden ist.

Diese Ergebnisse erklären auch, warum ein Monophosphatgehalt von 1,2 : 100000, 1,2 : 10000 bei NaCl-haltigem Saliv unwirksam bzw. wenig wirksam ist (NaCl und Monophosphat aktivieren beide den Speichel).

Daß eine noch größere Monophosphatkonzentration (1‰) inaktivierend wirkt, darf man in Übereinstimmung mit dem bekannten Verhältnis der Salzsäure gegen Ptyalin durch die Vermehrung der H-Ionenkonzentration erklären.

Als Beleg für diese Auffassung läßt sich anführen:

1. Ein Zusatz von NaCl, welches Salz doch beim Diphosphat eine so große Wirkung aufweist, ist beim Monophosphat (1,2 : 1000) ohne oder so gut wie ohne Erfolg. (In einem Versuch z. B. gefunden 8,1 mg gegen 5,1 mg).

2. Dagegen vermag ein Zusatz von Dinatriumphosphat die inaktivierende Wirkung des Monophosphats aufzuheben. (Demgemäß ist auch die absolute Wirkung des Monophosphats (1 : 1000) auf dem nativen Speichel je nach dem Alkaligehalt desselben etwas verschieden [von 0 bis 5,8 mg gefunden].)

Gegen die Auffassung sprechen aber anscheinend einige Versuche, die zuerst besprochen werden sollen. Wenn man einen mit Monophosphat (1,2 : 1000) versetzten Speichel dialysierte, durfte man mit der Diffusion des überschüssigen Phosphats eine dem Phosphatgehalt 1 : 10000 bis 100000 entsprechende Steigerung der Ptyalinwirkung annehmen. Dies ist aber nur zum geringsten Teil der Fall. In einem Versuche ergaben 0,1 ccm Saliv mit 0,1 ccm 14%igem Monophosphat und 10 ccm Stärkelösung 5,8 mg D. Nach Dialyse gegen 2,5 l H_2O von 1 ccm Saliv + 1 ccm 14%ige $NaH_2PO_4.H_2O$ während 24 Stunden wurden gefunden 9,8 mg und nach 48 Stunden 6,2 mg (zu den letzten Versuchen wurden selbstverständlich 0,2 ccm der gemischten Lösung benutzt). 0,1 ccm Saliv + 0,1 ccm 1,4%ige $NaH_2PO_4.H_2O$ ergaben aber 27,5 mg.

Nun könnte man aber denken, daß das gebundene Phosphat schneller als das NaCl fortdissoziierte. In solchem Falle mußte ein Zusatz von NaCl um so wirksamer sein. Dies ist aber nur zum Teil der Fall. Ein Zusatz von 1 : 1000 NaCl zum phosphathaltigen, dialysierten Speichel ergab 15,4 bzw. 14,8 mg gegenüber 32,6 mg beim nativen Speichel mit derselben NaCl-Menge versetzt. Da nun auch ein Zusatz von Dinatriumphosphat (sogar mit NaCl 1 : 1000 zusammen), das sonst beim monophosphatbehandelten Saliv sehr wirksam ist, ziemlich wirkungslos sich erwies (16,5 mg gefunden), muß man entweder annehmen, daß das Ptyalin jetzt zum Teil in das Dialysat übergegangen ist (zu welcher Annahme kein Grund vorliegt), oder auch, daß das vom NaCl befreite Ptyalin nach und nach dauernd inaktiviert wird. Daß diese letztere Annahme die richtige ist, geht aus der Tatsache hervor, daß sowohl das

dialysierte wie ganz besonders das mit Dinatriumphosphat versetzte und dialysierte Saliv ebenfalls nach und nach und sogar recht rasch dauernd inaktiviert werden (mit der Folge, daß NaCl nicht mehr reaktivierend wirkt), während der filtrierte, nicht dialysierte Speichel, wie schon Wohlgemuth u. a. gefunden haben, lange Zeit sich unverändert erhält. Die Verbindung mit NaCl schützt also das Ptyalin gegen Zerfall.

Wie oben bemerkt, läßt sich das durch Natriummonophosphat inaktivierte Ptyalin beim Zusatz von Dinatriumphosphat wieder reaktivieren, bzw. beim gleichzeitigen Zusatz der beiden Salze kommt die Hemmungswirkung des Monophosphats nicht zum Vorschein.

Tabelle XI.
Versuch Nr. 1.

Stärkelösung ccm	Saliv (alt, nicht dialysiert) ccm	3,6% $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ ccm	1,38% $NaH_2PO_4 + H_2O$ ccm	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	—	—	26,7
10	0,1	0,1	—	10,9
10	0,1	0,1	0,02	17,5
10	0,1	0,1	0,05	22,3
10	0,1	0,1	0,10	27,6

Aus der Tabelle XI geht hervor, daß schon eine ganz geringe Menge äquimolekularer Monophosphatlösung (1 : 5 Diphosphat) der Hemmungswirkung des Diphosphats wesentlich entgegenzuwirken vermag. Auf der anderen Seite spielt beim Überschuß von Monophosphat das Dinatriumphosphat schon in ganz geringer Menge (1 : 10 Monophosphat) dieselbe schützende Rolle, wie Tabelle XII zeigen kann.

Tabelle XII.
Versuch Nr. 2.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	3,5% $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ ccm	13,8% $NaH_2PO_4 + H_2O$ ccm	Gebildeter Zucker mg
	(frische)			
10	0,1	—	—	29,6
10	0,1	0,1	—	11,9
10	0,1	—	0,1	5,8
10	0,1	0,1	0,02	31,0
10	0,1	0,1	0,04	30,9
10	0,1	0,1	0,06	30,1
10	0,1	0,1	0,08	29,6
10	0,1	0,1	0,10	28,4

Tabelle XII, Versuch Nr. 2 (Fortsetzung).

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	3,5% $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ ccm	13,8% $NaH_2PO_4 + H_2O$ ccm	Gebildeter Zucker mg
	(alt, dialysiert, entspricht demselben in Vers. Nr. 1)			
10	0,1	—	—	8,3
10	0,1	—	—	28,1[1])
10	0,1	0,1	—	1,4
10	0,1	—	0,1 1,4%	7,3
10	0,1	0,1	0,02 1,4%	2,8
10	0,1	0,1	0,05 1,4%	4,3
10	0,1	0,1	0,10 1,4%	6,7
10	0,1	0,1	0,02 14%	7,6
10	0,1	0,1	0,05	11,2
10	0,1	0,1	0,10	12,3

Zur besseren Übersicht sind die Werte in Fig. 4 zusammengestellt.

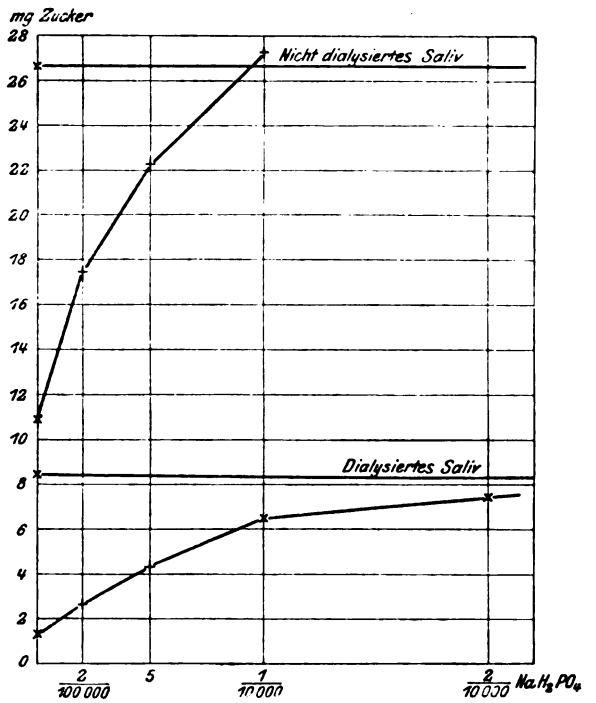


Fig. 4.

Versuch Nr. 3. a) 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv + 0,1 ccm 3,6% $Na_2HPO_4.12H_2O$ + 0,1 ccm 14% NaH_2PO_4 + H_2O = 25,8 mg.

[1]) + 0,10 ccm 1% NaCl.

b) 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv + 0,1 ccm 14% NaH_2PO_4 + H_2O. Nach 1 Stunde wurde 0,1 ccm 3,6% Na_2HPO_4 + $12H_2O$ zugesetzt = 24,8 mg. (Digestionszeit mit den beiden Salzen 1 Stunde.)

Aus diesen Versuchen geht erstens hervor, daß die Hemmungswirkung des einen Phosphats durch Gegenwart des anderen aufgehoben wird. Und da ferner eine bestimmte Quantität des einen Phosphats gegen recht verschiedene Quantitäten des anderen schützen kann und vice versa, haben wir hier augenscheinlich eine solche „Pufferwirkung", deren Bedeutung Sörensen vorgezogen hat. Aus diesem Grunde verdienen auch die obigen Befunde eine Bearbeitung nach den elektrometrischen und colorimetrischen Methoden. Äußere Gründe haben hier eine solche Bearbeitung verhindert. Zweitens ist aber ersichtlich, daß die Wirkung des Ptyalins bei Gegenwart der beiden Phosphate je von der ursprünglichen Aktivität des Speichels abhängig ist. Diese Wirkung hängt aber intim mit dem NaCl-Gehalt zusammen. Demgemäß reagieren also hier drei Salze, NaCl, Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4, miteinander und mit dem Ptyalin.

III.

In einer Arbeit aus dem hiesigen Institut hat Lapidus[1]) eine stark hemmende Wirkung des Handelslecithins auf Diastasen konstatieren können. Es lag daher recht nahe, nachzusehen, wie sich dies Lecithin (Agfa) bei und ohne Gegenwart von Salzen verhielt. Als Stammlösung dienten zwei 10%ige L.-Aufschwemmungen in dest. Wasser.

In Übereinstimmung mit Lapidus habe ich zuerst gefunden, daß ein Zusatz von etwa 1 : 1000 L. die Ptyalinwirkung herabsetzt. Doch waren die Ausschläge in meinen Versuchen nicht so groß wie sie Lapidus gefunden hat. Der Unterschied besteht wahrscheinlich darin, daß ich eine rein wässerige, Lapidus aber eine methylalkoholische Stammlösung benutzte. Wenn ich deswegen eine entsprechende Menge Methylalkohol (0,1 ccm) zusetzte, kam auch die Hemmungswirkung des Lecithins stärker hervor.

Lecithin und Kochsalz.

Während sonst NaCl eine stark aktivierende Wirkung besitzt, ist es bei Gegenwart von Lecithin so gut wie völlig unwirksam. (Vgl. Tabelle XIII; siehe auch Fig. 1.)

[1]) Lapidus, diese Zeitschr. 30, 39, 1910.

Tabelle XIII.

Stärkelösung ccm	Dialysiertes Saliv ccm	10% Lecithin ccm	NaCl-Lösung ccm	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	0,1	—	18,4
10	0,1	0,1	0,1 0,1%	20,4
10	0,1	0,1	0,5 0,1%	19,7
10	0,1	0,1	0,1 1%	18,6
10	0,1	0,1	0,1 10%	18,6
10	0,1	—	0,1 1%	34,6
10	0,1	—	—	25,8
10	0,1	0,1	—	16,5
10	0,1	0,1	0,1 0,1%	18,4
10	0,1	0,1	0,1 1%	18,6
10	0,1	0,1	0,1 10%	16,7

Lecithin und Dinatriumphosphat.

Während Dinatriumphosphat sonst einen sehr starken Hemmungskörper für Ptyalin darstellt, ist es bei Gegenwart von Lecithin umgekehrt ein Aktivator.

Tabelle XIV.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	10% Lecithin ccm	$Na_2HPO_4 . 12H_2O$ ccm	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	—	—	25,8
10	0,1	0,1	—	16,5
10	0,1	0,1	0,1 0,36%	24,1
10	0,1	0,1	0,1 3,6%	23,1
10	0,1	0,1	0,1 36%	12,9

Solche Quantitäten Phosphat, die sonst das Ptyalin beinahe vollständig inaktivieren, sind hier in den Lecithinversuchen geradezu Aktivatoren geworden.

Lecithin und Monophosphat.

Die Wirkung des Monophosphats ist bei Gegenwart von Lecithin ganz dieselbe wie ohne L. Das Lecithin ist also hier wirkungslos.

Tabelle XV.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	10% Lecithin ccm	$NaH_2PO_4 . H_2O$ ccm	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	—	—	23,4
10	0,1	0,1	—	16,5
10	0,1	0,1	0,1 0,14%	18,0
10	0,1	0,1	0,1 1,4%	13,6
10	0,1	0,1	0,1 14%	3,3

Überblickt man die obigen Salz-Lecithin-Versuche, so läßt sich die L.-Wirkung leicht erklären: Das L. stellt ein Gemisch von Dekompositionsprodukten dar, wovon hier die Säurebestandteile interessieren. Nur solche können der Wirkung des Diphosphats entgegentreten, aber müssen aus demselben Grunde beim Monophosphat indifferent sein. Interessant und nicht erklärt ist aber die prägnante Wirkung des L. gegen NaCl.

Außer dem Handelslecithin wurden auch die Lipoide der Leber untersucht.

Der größte Teil einer Kaninchenleber, die durch Perfusion mit Rohrzuckerlösung blutfrei gemacht worden war, wurde bei 30° und Ventilation getrocknet (Trockengewicht 49,0 g). Das Residuum wurde erst mit Äther und dann mit Alkohol extrahiert. Ätherextrakt = 2,1 g, davon acetonlöslich 0,8 g. Die acetonunlösliche Fraktion wurde mit 10 Teilen Wasser emulsioniert. a) 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv = 33,9 mg D. b) 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv + 0,1 ccm der Emulsion = 33,9 mg D. Alkoholextrakt 2,1 g, davon acetonlöslich 0,45 g. Die acetonunlösliche Fraktion wurde mit 10 Teilen Wasser emulsioniert. a) 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv = 31,4 mg D. (b 10 ccm Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv + 0,1 ccm der Emulsion = 31,4 mg D.

Die acetonunlösliche Fraktion des Ätherextraktes enthielt keinen Zucker. Diejenige des Alkoholextraktes 4,5 mg D. in 1,0 ccm.

Also waren sowohl Ätherextrakt wie Alkoholextrakt gegen Ptyalin und Stärkelösung völlig indifferent.

In einem anderen Versuch wurde die Kaninchenleber direkt mit Alkohol extrahiert und der Alkohol auf dem Wasserbade entfernt. Reichliches Residuum, das zuerst mit Wasser überschichtet wurde. Das Wasser wurde abdekantiert und der Rückstand in 30 ccm H_2O suspendiert.

Tabelle XVI.

Stärkelösung ccm	Saliv ccm	Alkohol-extrakt ccm	NaCl-Lösung ccm	Gebildeter Zucker mg
10	0,1	—	—	32,0
10	0,1	0,1	—	29,1
10	0,1	0,1	0,1 0,1%	29,1
10	0,1	0,1	0,1 1%	30,3
10	0,1	0,1	0,1 10%	29,7

Im letzten Falle haben die Leberlipoide die Diastasewirkung wirklich etwas, obwohl nur recht wenig, herabgesetzt. Ein Zusatz von NaCl ist wie in den Lecithinversuchen wirkungslos.

IV.

Daß das Glykogen vom Speichel invertiert wird, ist eine bekannte Tatsache. Dagegen existieren meines Wissens keine vergleichenden Untersuchungen zwischen der Ptyalinwirkung auf Lösungen von Stärke und Glykogen. Da aber verschiedene Stärkesorten ungleich stark verzuckert werden, liegt es nahe, Unterschiede zwischen Stärke und Glykogen anzunehmen. Solche kommen auch tatsächlich vor, wie z. B. aus den folgenden Versuchen hervorgeht:

Tabelle XVII.

Digestionszeit mit Saliv Min.	Zucker gebildet aus 1% Stärkelösung mg	Zucker gebildet aus 1% Glykogenlösung mg
5	5,0	3,4
10	9,3	6,0
15	13,9	8,7
30	25,2	15,1
60	45,7	19,6
1200	69,8	29,6

Saliv überall 0,1 ccm (frisch) auf 10 ccm Stärke- bzw. Glykogenlösung, bei denen die obigen Ziffern gefunden worden sind. Temp. 16 bis 18°. (Vgl. übrigens auch Fig. 5 S. 440.)

Wie aus den gefundenen Werten hervorgeht, wird eine Glykogenlösung sehr viel langsamer als eine entsprechende Stärkelösung angegriffen. Nach 1 Stunde Digestion wird z. B. mehr als die doppelte Zuckermenge bei der Stärkelösung gefunden.

Untersucht man die Sache etwas genauer, so wird man weiter auch einen anderen Unterschied bemerken. Schon kurze Zeit nach dem Speichelzusatz zur Stärkelösung findet man die Lösung völlig aufgeklärt und es läßt sich leicht zeigen, daß unveränderte Stärke nicht mehr vorkommt. Alles ist in lösliche Stärke und Dextrine umgebildet. Aus diesen wird dann nach und nach der Zucker selbst gebildet.

Beim Glykogen ist die Sache anders. Hier hält sich die Opalescenz lange, $^1/_2$ bis 1 Stunde; die Lösung wird aber immer mehr, obwohl nur langsam, durchsichtig. Es existiert also fortwährend unverändertes Glykogen neben gebildetem Zucker und Dextrinen. (Es kann nämlich kein Zweifel darüber existieren, daß auch hier Dextrine gebildet werden, wie Versuche mich gelehrt haben.)

Wie bei der Stärke beeinflussen auch hier Salze stark die Zuckerbildung aus Glykogen durch Ptyalin.

Glykogen und Kochsalz.

Schon die Alkoholfällung, die bei der Stärkeverzuckerung indifferent ist, setzt die Ptyalinwirkung hier stark herab; durch Zusatz von NaCl läßt sich die Wirkung reaktivieren.

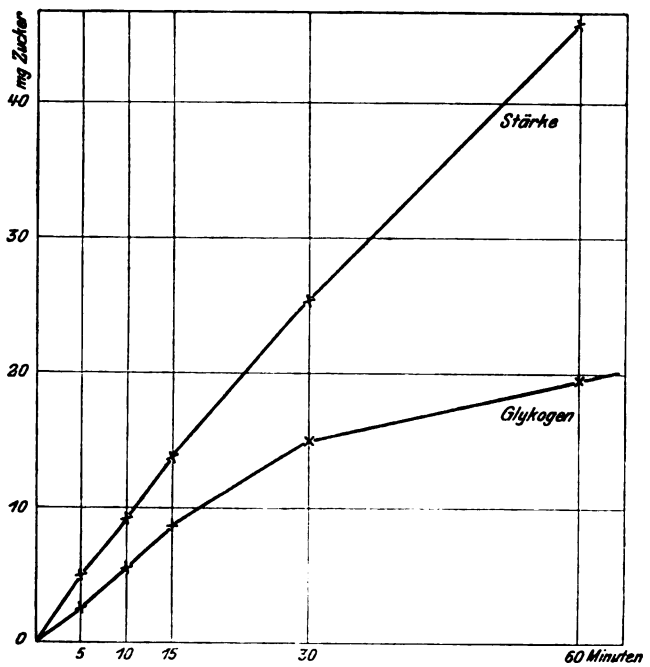


Fig. 5.

Versuch. a) 10 ccm 1%ige Glykogenlösung + 0,1 ccm Saliv = 17,5 mg. 10 ccm 1%ige Glykogenlösung + 0,1 ccm von 1 mal mit Alkohol gefälltem Ptyalin = 10,4 mg. Dasselbe Saliv aber mit Kochsalzlösung versetzt = 18,6 mg (NaCl = 0,7% der Stärkelösung). b) Kontrolle. 10 ccm 1%ige Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv = 30,2 mg. 10 ccm 1%ige Stärkelösung + 0,1 ccm 1 mal mit Alkohol gefälltem Ptyalin = 27,7 mg.

Die reaktivierende Wirkung des Kochsalzes kommt auch sehr schön bei den Phosphatversuchen hervor.

Glykogen und Dinatriumphosphat.

Einige Versuche sind in der Tabelle XVII zusammengestellt. Hier ist auch die reaktivierende Wirkung des NaCl ersichtlich. (Vgl. auch Fig. 2.)

Tabelle XVII.

Saliv (dialysiert) ccm	1% Glykogenlösung ccm	$Na_2HPO_4 . 12H_2O$ ccm	NaCl-Lösung ccm	H_2O ccm	Gebildeter Zucker mg
0,1	10	—	—	0,5	12,8
0,1	10	—	0,1 1%	0,4	22,3
0,1	10	0,1 3,6%	—	0,5	2,9
0,1	10	0,1 „	0,1 0,1%	0,4	11,2
0,1	10	0,1 „	0,2 „	0,3	11,2
0,1	10	0,1 „	0,5 „	0,2	14,6
0,1	10	0,1 „	0,1 1%	0,5	19,2

Die Ziffern zeigen erstens eine starke reaktivierende Wirkung des NaCl bei dialysiertem Speichel (der auf Stärke kräftig wirkt). Zweitens geht aus ihnen hervor, daß schon 0,1 ccm 3,6% $Na_2HPO_4 + 12H_2O$-Lösung eine so gut wie vollständige Inaktivierung bewirkte, welche Wirkung aber schon durch 1:100000 NaCl aufgehoben wurde. Demgemäß bewirkte ein NaCl-Zusatz auf 1:10000 auch hier ungefähr dieselbe Aktivierung wie beim ursprünglichen Speichel.

Glykogen und Monophosphat.

Während das Monophosphat bei Konzentrationen 1:100000 bis 10000 nur eine ganz geringe und dann öfters hemmende Wirkung auf die Stärke besaß, findet man umgekehrt beim Glykogen eine sogar starke Aktivierung, wie die folgenden Versuche zeigen (vgl. auch Fig. 3).

Tabelle XVIII.

Saliv ccm	1% Glykogenlösung ccm	$NaH_2PO_4 . H_2O$ ccm	Gebildeter Zucker mg
0,1	10	—	12,0
0,1	10	0,1 0,138%	15,2
0,1	10	0,1 1,38%	19,0

Selbstverständlich bewirkt auch beim Glykogen das Monophosphat eine Reaktivierung des durch Dinatriumphosphat gehemmten Ptyalins. Die folgende Tabelle zeigt einige Versuche hierüber.

Die Ergebnisse stimmen mit den Befunden bei Stärke (Tabelle XII) völlig überein.

Tabelle XIX.

Saliv ccm	1% Glykogenlösung ccm	3,6% $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ccm	NaH_2PO_4-Lösung ccm	Gebildeter Zucker ccm
0,1	10	—	—	19,5
0,1	10	0,1	—	9,0
0,1	10	0,1	0,1 0,138%	12,7
0,1	10	0,1	0,1 1,38%	23,3

Glykogen und Lecithin bzw. Leberphosphatide.

Im Gegensatz zu der Digestion der Stärkelösung wird die Glykogendigestion durch Lecithin **gar nicht** beeinflußt, oder richtiger, sie wird befördert.

Versuch. 10 ccm Glykogenlösung + 0,1 ccm Saliv = 17,5 mg. Dieselbe Mischung + 0,1 ccm 10% Lecithin 20,0 mg. Bei Gegenwart von 0,7% NaCl wurden gefunden 18,4 mg und 19,5 mg. Korrespondierende Stärkeversuche ergaben 30,2 mg bis 22,7 mg, oder mit NaCl 32,0 mg und 22,0 mg. Die Beweiskraft dieser letzten Versuche wird jedoch dadurch beeinträchtigt, daß die Stärkelösungen in den Lecithinversuchen 24 Stunden alt waren. Wie schon vorher erwiesen, wird jedoch auch sonst eine Hemmung gefunden.

Denselben Gegensatz zwischen Stärke und Glykogen zeigen die Versuche mit Leberphosphatiden. Wie oben gezeigt, war die Wirkung dieser Phosphatide bei Stärke so gut wie keine. Dagegen wurde beim Glykogen, besonders für das sekundäre Alkoholextrakt, eine stark aktivierende Wirkung gefunden. Das Atherextrakt war etwas weniger wirksam.

Tabelle XX.

	10 ccm 1% Stärkelösung + 0,1 ccm Saliv ccm	10 ccm 1% Glykogenlösung + 0,1 ccm Saliv ccm
—	26,3	12,0
0,1 ccm Atherextrakt . .	23,4	17,0
0,1 „ Alkoholextrakt .	27,0	21,0

In einem anderen Versuche wurde gefunden a) ohne Alkoholextrakt 10 ccm 1% Glykogenlösung + 0,1 Saliv 16,9 mg, b) mit 0,1 ccm Alkoholextrakt nur 26,7 mg.

Das sekundäre Alkoholextrakt der Leber besitzt also eine unzweifelhaft befördernde Wirkung auf die Zuckerbildung aus Glykogen durch Ptyalin.

Methodologische Notizen.

Von

Ivar Bang.

(Eingegangen am 13. April 1911.)

1. Bemerkungen über die Darstellung der Kupferlösung für meine Zuckertitrationsmethode.[1])

Der Vorschrift nach soll man erst 500 g Kaliumcarbonat, 400 g Kaliumrhodanat und 100 g Kaliumbicarbonat in ca. 1300 ccm H_2O auflösen. Dies nimmt aber eine ziemlich lange Zeit in Anspruch, selbst wenn man, wie vorgeschrieben, die Salze mit dem Wasser auf 65° erhitzt und oft schüttelt. Es hat sich deshalb als besonders vorteilhaft bewährt, erst die 100 g Bicarbonat in den 1300 ccm Wasser zu lösen, was auch bei Zimmertemperatur rasch — in einigen Minuten — geht. Die übrigen Salze lösen sich dann nachher zugesetzt augenblicklich auf. Jetzt wird die Kupferlösung zugesetzt. Anstatt aber jedesmal 25 g $CuSO_4 + 5\,H_2O$ abzuwiegen usw., ist es zu empfehlen, besonders wenn man schnell seine Lösungen verbraucht, 166,67 g $CuSO_4 + 5\,H_2O$ in Wasser zu lösen und auf 1 l zu ergänzen. 150 ccm von dieser Kupferlösung werden dann bei Zimmertemperatur mit der Pipette zu der schon bereiteten Salzlösung zugefügt, wonach man durch leises Schütteln die Flüssigkeiten mischt. Nach einigen Minuten, wenn die schwache CO_2-Entwicklung vorbei ist, ergänzt man auf 2 l, schüttelt gut durch und filtriert gleich. Die filtrierte Kupferlösung ist nun zur Zuckertitration fertig.

2. Über die Phosphorsäurebestimmung nach Neumann.

Nach diesem ausgezeichneten Verfahren wird bekanntlich die Substanz erst durch das Säuregemisch verascht, weiter als

[1]) Diese Zeitschr. 2, 271, 1907; 11, 538, 1908.

Ammoniummolybdat niedergeschlagen und schließlich das Ammoniak durch überschüssiges $^n/_2$-KOH und Kochen entfernt. Eine dem Ammoniak entsprechende Menge Kalium wird aufgenommen und die Differenz durch Titration mit $^n/_2$-Säure bestimmt. Hieraus läßt sich das Phosphor berechnen.

Der schwache Punkt der Methode ist die Entfernung des freigemachten Ammoniaks. Man kocht so lange, bis ein angefeuchtetes Lackmuspapier, über die kochende Flüssigkeit gehalten, keine Reaktion mehr gibt. Es dauert also recht lange, bis dieser Endpunkt eintritt, da der Kaliüberschuß doch recht gering ist. Weiter stößt die Flüssigkeit wegen des fein verteilten Papiers, ein kontinuierliches Rühren ist also notwendig, der heißen Dämpfe wegen aber unangenehm.

Diese Unannehmlichkeiten lassen sich durch Verwendung der Formoltitrierung ausschalten. Bekanntlich bildet sich aus dem Ammoniak und dem Formaldehyd Hexamethylentetramin, das indifferent ist. Durch einen Zusatz von Formol zu der mit $^n/_2$-KOH alkalisierten Flüssigkeit wird also der Ammoniak quantitativ entfernt, und durch Zurücktitrierung mit $^n/_2$-Säure wird die verbrauchte Menge Kalilauge und damit die Phosphorsäure bzw. der Phosphor gefunden.

Praktisch gestaltet sich das Verfahren folgendermaßen: Der ausgewaschene Molybdatniederschlag wird in das ursprüngliche Becherglas übergeführt, man setzt etwas Wasser und nachher $^n/_2$-KOH hinzu, bis der Niederschlag vollständig gelöst worden ist. Dann werden 50 ccm Formollösung, die vorher mit 5 bis 6 Tropfen Phenolphthalein versetzt und bis zur beginnenden Rotfärbung titriert worden ist, zugefügt. Nach einigen Augenblicken titriert man mit $^n/_2$-Säure (Schwefel- oder Salzsäure) bis farblos und dann wieder mit der Lauge bis zur deutlichen Rotfärbung.

Daß diese Methode richtige Resultate geben muß, ist ohne weiteres einleuchtend und Belege sind eigentlich überflüssig. Folgendes Beispiel sei jedoch hier angeführt:

a) 50 ccm einer Ammoniumphosphatlösung lieferten nach der ursprünglichen Methode 42,44 ccm $^n/_2$-KOH = 23,51 mg P.

b) 50 ccm derselben Phosphatlösung mit Formoltitrierung ergaben 42,55 ccm $^n/_2$-KOH = 23,57 mg P.

3. Über die Darstellung der Mentholglucuronsäure.

Nach Neuberg und Lachmann[1]) läßt sich die Mentholglucuronsäure sehr bequem nach folgender Methode darstellen:

Der nach Verabfolgung von Menthol an Kaninchen gesammelte Harn wird mit Schwefelsäure angesäuert und mit Alkohol-Äther 4 Stunden ausgeschüttelt. Das Ätherextrakt wird mit Ammoniak versetzt, der Äther verjagt und die auskrystallisierte Masse mit etwas Wasser ausgewaschen. Das H_4-Salz kann dann entweder aus säurehaltigem Wasser umkrystallisiert werden oder auch über die Bleiverbindung gereinigt werden.

Diese Methode läßt sich noch einfacher machen: Man versetzt den gesammelten Harn mit Am_2SO_4 bis Halbsättigung, erhitzt zum Kochen und filtriert warm. Beim Abkühlen scheidet sich das NH_4-Salz der Mentholglucuronsäure schneeweiß aus, und zwar so gut wie quantitativ. Die freie Säure läßt sich dann entweder durch Umkrystallisation aus säurehaltigem Wasser oder Auflösen in säurehaltigem Alkohol bequem darstellen.

---

[1]) Neuberg und Lachmann, diese Zeitschr. 24, 416, 1910.

Die Schardinger-Reaktion der Milch.

Von

W. Rullmann.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität München.
Direktor: Obermedizinalrat Prof. Dr. M. v. Gruber.)

(*Eingegangen am 15. April 1911.*)

Während der Drucklegung meiner Arbeit: „Über Enzym- und Streptokokkengehalt aseptisch entnommener Milch“[1]) wurden mehrere Untersuchungen über die Schardingersche Reaktion veröffentlicht, über die ich zunächst kurz berichten will, um dann auf meine eigenen, schon damals begonnenen Untersuchungen überzugehen.

So führen Bredig und Sommer[2]) an, daß die Reduktion von Methylenblau mit Formaldehyd durch Metallkatalyse ein weiterer Beweis für die Möglichkeit der Mitwirkung anorganischer Körper bei der Schardingerschen Reaktion ist und daß auch die anorganischen Fermente, nämlich die kolloidalen Metallösungen eine in vieler Beziehung gleiche Wirkung auf das Schardinger-Reagens ausüben, wie das Enzym der keimfreien ungekochten Milch.

In der Arbeit von Römer und Sames[3]) wird auf S. 2 bis 3 angegeben, daß gekochte Milch Schardinger nicht mehr entfärbe, solches aber nach Zusatz von 0,2 bis 0,3 einer 1%igen frisch bereiteten Ferrosulfatlösung prompt ausführe.“ Es ist also auch hier ein fördernder Einfluß anorganischer Körper ersichtlich. Dann betonen die Autoren auf S. 3, „wie vorsichtig man bei Beurteilung sog. Enzymreaktionen

[1]) Arch. f. Hygiene 73, S. 81 bis 144. An dieser Stelle muß ich auf einen leider übersehenen Druckfehler in dieser Arbeit hinweisen; hier muß es Seite 128 in der fünften Zeile von oben statt „keimfrei“ keimreich heißen.

[2]) G. Bredig und F. Sommer, Zeitschr. f. physikal. Chem. 1901, Jubelband S. 1 bis 32. Anorganische Fermente und die Schardinger-Reaktion.

[3]) Römer und Sames, Zeitschr. f. Nahrungs- und Genußmittel 20, Heft 1, Beiträge zur Schardinger-Reaktion der Kuhmilch.

sein muß, wenn es möglich ist, mit Hilfe chemischer Reagenzien eine Art Modell für den angeblich enzymatischen Vorgang zu schaffen." Ein weiterer auf S. 5 befindlicher Satz, nach dem die Autoren bei ein und derselben Kuh häufig an direkt aufeinanderfolgenden Tagen das eine Mal prompt entfärbende, das andere Mal nicht entfärbende Milch fanden und daß sie (Absatz 2) durch sog. Staumilch, die also länger als die gewöhnliche Zeit im Euter gestanden hat, in der Regel keine Reaktion bekamen, wird im Verlaufe meiner Untersuchungen eingehend besprochen werden.

„Über einige Farbreaktionen zur Unterscheidung der erhitzten von roher Kuhmilch" lautet der Titel einer weiteren Arbeit von Th. Sames[1]); er sagt auf S. 468, daß die Schardingersche Reaktion zur Unterscheidung von roher und gekochter Milch bei alleiniger Anwendung nicht zu gebrauchen sei, da ein negativer Ausfall durchaus nicht auf stattgehabtes Erhitzen schließen lasse. Viele im Handel vorkommende Kuhmilch entfärbe Methylenblauformalin nicht; von ein und derselben Kuh könne man Milch ermelken, die die MF-Reaktion[2]) gibt (Endmilch), und ein andermal (Anfangsmilch oder Milch schlecht ausgemolkener Kühe) nicht gibt. Ferner sagt Sames, „ein positiver Ausfall der MF-Reaktion zeigt auch nicht immer Rohmilch an, da durch Zusatz einiger Kubikzentimeter Ferrosulfatlösung oder von etwas Lauge einer gekochten Milch rasch wieder die MF reduzierenden Eigenschaften verliehen werden können.

Dann muß hier noch Rothenfußers[3]) Arbeit: „Über den Nachweis von Fermenten unter besonderer Berücksichtigung der Milch" hervorgehoben werden; von mir angestellte Untersuchungen ergaben die Verläßlichkeit des empfohlenen Verfahrens und wird im Verlaufe der vorliegenden Untersuchungen eingehend darauf zurückgekommen.

Ferner sind noch die Arbeiten von Gramenitzki[4]) und Kulpsohn[5]) hier zu nennen, die die eventuelle Regeneration der durch Erhitzen zerstörten Enzyme behandeln. Auch hierüber folgen Untersuchungen.

Der Vollständigkeit halber sind auch noch Veröffentlichungen aus der allerneuesten Zeit anzuführen, so die von Reinhardt und Seibold[6]): „Über die Schardinger-Reaktion in Colostralmilch und in Milch von

---

[1]) Sames, Über einige Farbreaktionen. Milchw. Centralbl. 1910, 462, Heft 10.

[2]) Von jetzt an werden die häufig gebrauchten Lösungen von Methylenblau mit M, von Methylenblauformalin mit MF und von Methylenblauameisensäure mit MA bezeichnet.

[3]) Rothenfußer, Zeitschr. f. Nahrungs- und Genußmittel 16, 63ff., Heft 1 u. 2, 1908.

[4]) Gramenitzki, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, Heft 3/4, 1910.

[5]) Kulpsohn, Dissertation, Petersburg 1908.

[6]) Reinhardt und Seibold, diese Zeitschr. 31, Heft 3, 4, 5 u. 6, 1911.

euterkranken Kühen"; dann berichtet auch noch A. Bach[1]): „Über das Schardinger-Enzym (Perhydridase)". Die vorliegende Arbeit war aber abgeschlossen, als diese neuen Untersuchungen erschienen, und da sie keine Widersprüche gegen meine Resultate enthalten, so sei nur darauf verwiesen.

Infolge der in meiner eingangs zitierten Arbeit (S. 127, Absatz 2) gemachten Beobachtung, daß auch künstlich sterilisierte Milch, sofern sie nur genügend lange erhitzt wird, schon bei + 45 bis 50° C (bei höheren Temperaturen rascher) MF entfärbt, konnte ich den Schluß aufstellen, daß bei der sicheren Abwesenheit aller Enzyme jedenfalls thermostabile Körper die Veranlassung dazu seien. Wenn auch inzwischen durch die eingangs genannten Forscher meine Anschauung bestätigt worden ist, so möchte ich doch die grundlegenden Beweise hierfür anführen.

Da beim Verlaufe der Schardinger-Reaktion der Formaldehyd auf Kosten des Sauerstoffs von Methylenblau in Ameisensäure übergeht und die Oxydation nach U. bis zur Kohlensäure gesteigert wird, lag es nahe, zu versuchen, eine dem Formaldehyd äquivalente Menge Ameisensäure (100 Ameisensäure = 153,3 Formaldehyd) an Stelle des ersteren der Schardingerschen Methylenblaulösung zuzusetzen und hiermit vergleichende Untersuchungen anzustellen. Hierzu wurde zunächst nur sterilisierte Milch benutzt; die mehrfach wiederholten Versuche ergaben meist für MA längere Entfärbungszeiten als für MF, wie solches aus dem folgenden Versuche hervorgeht, bei dem jedoch neben besäter sterilisierter Milch auch besäte keimfrei erhaltene, unerhitzte Milch benutzt wurde. Es kamen hier Reinzuchten zur Verwendung, die ich gelegentlich meiner eingangs erwähnten Arbeit (S. 102ff.) erhalten hatte und die energisch Katalase und Reduktase bildeten.

Die bei 1. und 3. im nachstehenden Versuche verwendete sterilisierte Milch hat bei 50° C MF in 1h 12′ und bei 50° C MA in 1h 40′ entfärbt.

Wir sehen bei 3. gleichzeitige Entfärbung, während bei den anderen Proben die Differenzen zwischen MF und MA als recht beträchtlich zu bezeichnen sind.

---

[1]) A. Bach, diese Zeitschr. 31, 443, Heft 5/6, 1911.

Versuch 1.

Temperatur + 50° C.

Einsaat und Nährboden	+ MF	+ MA
1. Erreger 29 in sterilisierte Milch eingesät (48h bei + 37°)	entfärbt in 10′	entfärbt in 34′
2. Erreger 29 in keimfreie unerhitzte Milch eingesät (48h bei + 37°)	entfärbt in 4′	entfärbt in 33′
3. Erreger 35 in sterilisierte Milch eingesät (48h bei + 37°)	entfärbt in 27′	entfärbt in 28′
4. Erreger 35 in keimfreie unerhitzte Milch eingesät (48h bei + 37°)	entfärbt in 6′	entfärbt in 50′

Noch ein Versuch (2) möge folgen; hier wurden die Reinkulturen Nr. 6, 29 und 35 gleichfalls in sterilisierte, zu Versuch 1 hergestellte Milch eingesät und diese nach 48stündiger Bebrütung neben der Schardingerschen Reaktion auf Katalase- und Reduktasebildung nach Smidt-Müller untersucht.

Versuch 2.

Stamm Nr.	Katalase in 24h ccm	Smidt-Müller Methylenblau wird entfärbt	MF wird entfärbt	MA wird entfärbt
1. 6	9	in 23′	in 33′	in 45′
2. 29	10,2	„ 51′	„ 39′	„ 55′
3. 35	7,2	„ 40′	„ 30′	„ 30′

Auch dieser Versuch ergibt bezüglich der Entfärbungszeiten große Differenzen. Bei Nr. 1 beträgt der Unterschied der Entfärbungszeiten zwischen MF und MA 12′ und bei 2 16′, während bei 3 die Entfärbungszeiten vollkommen gleich sind. Ein Zusammenhang zwischen Katalase- resp. Sauerstoffbildung, Smidt-Müllerscher Methylenblaureaktion und MF und MA war nicht aufzufinden. Jedenfalls ist die Einwirkung von MA bewiesen. Vielleicht kann die meist energischere Entfärbung von MF dadurch hervorgerufen werden, daß die in diesem Falle in statu nascendi einwirkende Ameisensäure kräftiger reduzierend wirkt als die in MA zugesetzte. Daß aber das durch die verschiedenen Einsaaten gebildete Enzym auch wieder verschiedenartig einwirkt, zeigen sowohl die unter gleichen Umständen gebildeten Katalasemengen, als auch die unter sich

wechselnden Entfärbungszeiten bei Smidt-Müller und bei Schardinger-Reaktion.

Bei alleiniger Verwendung von sterilisierter unbesäter Milch lag die Möglichkeit nahe, daß Verschiedenheiten im Alter derselben von Belang seien. Es wurde daher frisch sterilisierte Milch am Tage der Fertigstellung geprüft; sie entfärbte bei + 50° C MF in 1h 30′, sieben Tage später entfärbte sie bei gleicher Temperatur MF in 1h 50′, vierzehn Tage später entfärbte sie bei gleicher Temperatur MF in 1h 35′.

Mit derselben sterilisierten Milch wurden unter gleichen Zeitumständen, wie oben geschildert, auch Versuche mit MA angestellt. Sie entfärbte bei + 50° C MA am Herstellungstage in 2h,
„ „ „ + 50° C MA sieben Tage später in 2h, und
„ „ „ + 50° C MA nach vierzehn Tagen in 2h 05′.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß das Alter der sterilisierten unbesäten Milch wenigstens bis zu 14 Tagen keinen belangreichen Einfluß auf die Entfärbungszeit ausübt.

Der folgende Versuch zeigt dagegen den Einfluß geringer Mengen von Natronhydrat, den ich bereits in meiner zitierten Arbeit (S. 129 oberster Satz) angedeutet habe; die Zusätze von Milchzucker sollten beweisen, ob sie beim Sterilisieren Karamel bilden und hierdurch einen erhöhten katalysierenden Einfluß ausüben.

Versuch 3.

Temperatur + 50° C.

a) 20 ccm steril. Milch ohne Zusatz entfärben 1 ccm MF in 1h 30′,
b) 20 „ „ „ + 0,020 g NaHO entfärben 1 ccm MF in 53′,
c) 20 „ „ „ + 0,020 g NaHO + 2 g Milchz. entf. 1 ccm MF in 40′,
d) 20 „ „ „ ohne NaHO + 2 g Milchz. entf. 1 ccm MF in 1h 15′.

Hier sehen wir, daß bei b) durch Zusatz geringer NaHO-Mengen die Entfärbung um etwa $^1/_3$ der Zeit beschleunigt wird, daß bei c), wo NaHO und zugesetzter Milchzucker einwirken, weniger als die Hälfte der ursprünglichen Zeit erforderlich ist, bei d) das Fehlen von NaHO-Zusatz und die Steigerung des Milchzuckergehaltes die Entfärbungszeit nicht erheblich abkürzt.

Nach diesen Ergebnissen wurden eine größere Anzahl von Reagensgläsern mit einer 5%ig. Milchzuckerlösung in destilliertem Wasser zu je 20 ccm gefüllt, sterilisiert und mit wechselnden

Mengen von NaHO versetzt, dann je 1 ccm Schardingersches Methylenblau ohne Formalin = M, bzw. 1 ccm MF oder 1 ccm MA hinzugefügt.

Versuch 4.

Temperatur + 50° C.

20 ccm 5%ige Milchzuckerlösung	+ 2 ccm n/4-NaHO-Lösung = 0,020 g	+ 1 ccm n/4-NaHO-Lösung = 0,010 g	+ 0,5 ccm n/4-NaHO-Lösung = 0,005 g	+ 0,2 ccm n/4-NaHO-Lösung = 0,002 g	+ 0,1 ccm n/4-NaHO-Lösung = 0,001 g	+ 0,05 ccm n/4-NaHO-Lösung = 0,0005 g
1. + 1 ccm M	1. Versuch, Entfärbg. in 5′ 2. Versuch in 4′	1. Versuch, Entfärbg. in 8′ 2. do.	1. Versuch, Entfärbg. in 9′ 2. do.	1. Versuch, Entfärbg. in 10′ 2. in 11′	Entfärbg. in 32′	Entfärbg. in 42′
2. + 1 ccm MF	1. Versuch, Entfärbg. in 5′ 2. Versuch in 4′	1. Versuch, Entfärbg. in 8′ 2. do.	1. Versuch, Entfärbg. in 8′ 2. do.	1. Versuch, Entfärbg. in 11′ 2. do.	Entfärbg. in 45′	nach 1h noch nicht entfärbt
3. + 1 ccm MA	Entfärbg. in 38′	in 1½h noch nicht entfärbt				

Ohne jeglichen Zusatz von Natronhydrat blieben dieselben Milchzuckerlösungen, 1½h bei + 50° C gehalten, auf die gleichen Farbstoffzusätze M, MF und MA ohne Einwirkung.

Aus diesem Versuche geht hervor, daß die Entfärbung der mit M, MF und MA versetzten Milchzuckerlösungen je nach der Zusatzmenge von NaHO schwankt, daß noch so geringe Mengen wie 2 mg in 20 ccm Milchzuckerlösung auf M und MF noch energisch und rasch einwirken, während 1 mg bereits mehr wie 30′ verlangt.

Bei MA zeigt sich, daß 0,02 g NaHO noch verhältnismäßig rasch einwirkt, geringerer Zusatz aber versagt.

Daß der Milchzucker allein einflußlos ist, beweisen die Proben gleicher Art, die ohne NaHO-Zusatz angestellt sind; hier war 1½stündige Erhitzung ohne jegliche sichtbare Änderung.

Hierauf kamen noch Zusätze von 1 ccm nachgenannter, im Verhältnisse 1:100 hergestellten Salzlösungen zur Prüfung.

1. Ammoniumchlorid,
2. Ammonphosphat,
3. Calciumphosphat, einbasisch,
4. „ zweibasisch,
5. „ dreibasisch,
6. Natriumphosphat, einbasisch,
7. „ zweibasisch,
8. „ dreibasisch.

Von diesen Salzlösungen reagiert Nr. 2 leicht, Nr. 7 kräftig und Nr. 8 stark alkalisch.

Die angestellten Vorversuche ergaben, daß diese Lösungen für sich allein ohne Milchzuckerzusatz von je 1 ccm in 20 ccm destilliertem Wasser ohne Einwirkung auf die Farblösung blieben. nur die Lösung 8 begann nach 1h zu entfärben.

Der Übersichtlichkeit halber folgen jetzt zunächst Versuchszeiten mit Ammoniakzusatz zu 5%igen Milchzuckerlösungen und dann Beobachtungen dieser Zusätze zu sterilisierter Milch.

Versuch 5.

Vorversuch bei + 60° und 95° C.

	+ 60° C	+ 95° C
1. 20 ccm sterilisierte 5%ige Milchzuckerlösung + 1 ccm MF als Kontrollprobe ohne weiteren Zusatz	in 1h 10′ nicht entfärbt	nach 10′ nicht entfärbt
2. wie vorstehend + 1 ccm NH_3 von 0,969 spez. Gewicht = 75 mg NH_3	in 5′ entfärbt	
3. wie bei 1. + 0,1 ccm NH_3 = 7,5 mg	in 18′ entfärbt	

Versuch 6

ist bei + 50° C und + 79° C angestellt.

1. 20 ccm steril. 5%ige Milchzuckerlös. + 1 ccm MF + 7,5 mg NH_3 entfärbt bei + 50° C in 20′
2. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ + 6,0 „ „ „ „ + „ „ 24′
3. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ + 3,75 „ „ „ „ + „ „ 30′
4. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ + 1,5 „ „ „ „ + „ „ 45′
5. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ + 0,75 „ „ „ „ + „ „ 1h
6. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ + 0,6 „ „ } 1h 20′ bei + 50° C | bei + 70° C 6 u. 7 hellen sich in weiteren 45′ etwas auf
7. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ + 0,375 „ „ }
8. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ + 0,075 „ „ ohne Einfluß | unbeeinflußt
9. 20 „ „ „ „ + 1 „ „ ohne NH_3-Zusatz bleibt bei 50° C und + 70° C unbeeinflußt als Kontrollprobe.

Die Versuche 5 und 6 zeigen bei den stärkeren Zusätzen eine kräftige Einwirkung des NH_3 als katalysierender Faktor. — Gehen wir nun zu den Versuchen mit den vorher erwähnten Salzlösungen des Ammoniums und Natriums über; in Versuch 7 findet sich die Einwirkung konzentrierterer, im Verhältnisse von 1:10 hergestellter Lösungen und der verdünnten 1:100 Lösungen von Ammoniumphosphat und zweibasischem und dreibasischem Natriumphosphat auf sterilisierte Milch.

Versuch 7.

	+ 60° C	+ 95° C	+ 60° C	+ 95° C
1. 20 ccm sterilisierte Milch + 1 ccm MF ohne weiteren Zusatz	in 1h 40′ noch nicht entfärbt	in 9′ entfärbt	—	—
	+ je 1 ccm Lösung 1:10		+ je 1 ccm Lösung 1:100	
2. 20 ccm sterilisierte Milch + 1 ccm MF + 1 ccm Lösung Nr. 2	in 1h noch nicht entfärbt	in 6′ entfärbt	in 1h 40′ noch nicht entfärbt	in 9′ entfärbt
3. wie vorstehend + 1 ccm Lösung Nr. 7			nach 1h beginnt Entfärbung	in 7′ entfärbt
4. wie vorstehend + 1 ccm Lösung Nr. 8	in 45′ entfärbt	in 7′ entfärbt	in 1h 40′ noch nicht entfärbt	in 8′ entfärbt

Es ergibt sich aus Versuch 7, daß die verwendeten Salze auch in der sterilisierten Milch eine katalytische Wirkung ausüben, aber die Zusätze sind auch sehr beträchtlich, und wenn man die ohne Zusatz bei + 95° C beobachtete sterilisierte Milch mit den mit Ammonium- und Natriumphosphaten versetzten anderen Proben vergleicht, dann zeigt sich nur ein geringer Unterschied im zeitlichen Eintreten der Entfärbung und dabei haben die verwendeten verdünnten Lösungen (1:100) immer noch einen Gehalt von 1 cg des betreffenden Salzes auf 20 ccm Milch.

In den folgenden Versuchen, die mit wechselnden und bis zu 0,075 mg herabgehenden Zusätzen von Ammoniak ausgeführt sind, wird sich die energischere Einwirkung dieses Körpers zeigen.

Versuch 8.

+ 50° C.

1.	20 ccm	sterilisierte	Milch	+ 1 ccm	MF	+ 7,5	mg	NH_3	entfärbt in	57′
2.	20 „	„	„	+ 1 „	MF	+ 6,0	„	„	„ „	1h 25′
3.	20 „	„	„	+ 1 „	MF	+ 3,75	„	„	„ „	3h nur 1/2
4.	20 „	„	„	+ 1 „	MF	+ 1,5	„	„	„ „	3h nur eine geringe Spur
5.	20 „	„	„	+ 1 „	MF	+ 0,75	„	„	hat in 3h keinen Einfluß ausgeübt	

Da vielseitige Erfahrung die stets wechselnde Zusammensetzung sterilisierter Milch deutlich gezeigt hatte, so wurde ein nochmaliger Kontrollversuch mit frisch sterilisierter Milch (Versuch 9) und mit den schon erwähnten Minimalzusätzen an Ammoniak ausgeführt.

Versuch 9.

+ 50° C.

1.	20 ccm	ster.	Milch	+ 1 ccm	MF	+ 7,5	mg	NH_3	entfärbt in	1h 50′
2.	20 „	„	„	+ 1 „	„	+ 6,0	„	„	„ „	2h 20′
3.	20 „	„	„	+ 1 „	„	+ 3,75	„	„	„ „	2h 50′
4.	20 „	„	„	+ 1 „	„	+ 1,5	„	„		
5.	20 „	„	„	+ 1 „	„	+ 0,75	„	„		
6.	20 „	„	„	+ 1 „	„	+ 0,60	„	„		
7.	20 „	„	„	+ 1 „	„	+ 0,375	„	„		
8.	20 „	„	„	+ 1 „	„	+ 0,075	„	„		
9.	20 „	„	„	+ 1 „	„	ohne Ammoniakzusatz, als Kontrollprobe				

2h bei + 50° C waren ohne sichtbaren Einfluß, sodann eingesetzt in Wasserbad von 70°

+ 70° C

entfärbt in weiteren 15′

„ „ „ 25′

6, 7, 8 und 9 in weiteren 32′ gleichzeitig entfärbt

Aus diesem Versuche zeigt sich, daß die unversetzte sterilisierte Milch Nr. 9 MF in derselben Zeit entfärbte als die mit den Minimalzusätzen versehenen Proben 6, 7 und 8. Ob sich hieraus ein Schluß auf die ungefähre Menge der die Entfärbung herbeiführenden Mengen thermostabiler Körper bezüglich des Ammoniakgehaltes ziehen läßt, bleibt dahingestellt.

Zunächst folgen jetzt Versuche mit wechselnden Zusatzmengen von NaHO zu Rohmilch, hieraus gewonnener pasteurisierter und 3mal aufgekochter Milch.

Da frisch pasteurisierte Milch mir täglich zur Verfügung stand, so habe ich den Versuch mit MF des öfteren wiederholt, aber auch hierbei immer wechselnde Entfärbungszeiten gefunden, während die Schwankungen der zur Ermittelung des Enzymgehaltes angeführten Storchschen Reaktion

mit Paraphenylendiaminchlorhydrat + H_2O_2, die ich mehrere Jahre hindurch bei Kontrolle einer Molkerei in vielen hundert Fällen ausführte, sehr selten von Belang waren. Hiernach dürfte wohl bei sorgfältiger Darstellung pasteurisierter Milch bei Einhaltung der Temperatur 68 bis 69° C selten eine tiefgreifende Enzymschädigung eintreten, dagegen das schwankende Verhalten zu MF möglicherweise durch wechselnden Gehalt der Milch an thermostabilen Stoffen zu erklären sein.

Versuch 10.

+ 45 bis 50° C.

Milchzustand	MF ohne Zusatz	MF + 20 mg NaOH	MF + 10 mg NaHO	MF + 5 mg NaHO	MF + 2 mg NaHO	MF + 1 mg NaHO
je 20 ccm roh und frisch	entfärbt in 5′	in 1′ entfärbt		in 2′	in 3′ entfärbt	in 4′
pasteurisiert nach Forster-Gerber	nach 1h noch nicht vollkommen entfärbt	in 23′	in 35′ entfärbt	in 50′	nach 1h noch nicht entfärbt	
3 mal aufgekocht	nach 2h noch keine Entfärbung					

Wir gehen nun zu einem Versuche mit $^1/_2$ Stunde aufgekochten Milch über, der dieselben Mengen von Ammoniak wie bei Versuch 9 zugesetzt sind.

Versuch 11.

5. I. 11.

Je 20 ccm $^1/_2$h gekochter Milch wurden zugesetzt je 1 ccm MF.

	hierauf auf 70° C:
1. + 7,5 mg NH_3	nach weiteren 35′ entfärbt
2. + 6,0 „ „	„ „ 56′ „
3. + 3,75 „ „	„ „ 1h 10′ „
4. + 1,50 „ „	„ „ 1h 30′ „
5. + 0,75 „ „	
6. + 0,60 „ „	
7. + 0,375 „ „	
8. + 0,075 „ „	
9. Kontrollprobe ohne Zusatz	

2h bei + 50° C ohne sichtbaren Einfluß

Da die Proben 5 bis 9 inkl. bei + 70′ nach vorstehender Zeit noch keine Farbänderung zeigten, so kamen sie in ein Wasserbad von + 90° C und wurden hier nach weiteren 10′ alle gleichzeitig entfärbt.

Die zu diesem Versuche verwendete $^1/_2$h gekochte Milch enthielt nach dem Verfahren von Nencki und Zaleski, das

später noch besprochen wird, in 100 ccm 0,68 mg NH_3, so daß in den 20 ccm der Kontrollprobe 0,136 mg enthalten waren, welcher Gehalt zwischen den Zusätzen von Nr. 7 und 8 liegt.

Um nun einen Einblick in die bei der Sterilisierung gegenüber einem $^1/_2$stündigen Aufkochen gleicher Milch eintretende Beeinflussung der verschiedenen Milchbestandteile und besonders der Eiweißstoffe zu gewinnen, wurde zunächst die zu verwendende Rohmilch der Schardinger-MF-Reaktion unterzogen, ihr Keim- und Katalasegehalt bestimmt und dann eine Anzahl Röhrchen mit je 20 ccm Inhalt der im Institute gebräuchlichen Sterilisierungsmethode unterzogen; der Rest wurde $^1/_2$ Stunde aufgekocht, nach dem Erkalten und Auffüllen mit sterilisiertem destilliertem Wasser auf das ursprüngliche Volum gebracht und gleichfalls zu 20 ccm in Röhrchen gegeben. Auch von dieser gekochten Milch wurde nach Nencki und Zaleski der NH_3-Gehalt ermittelt.

Aus Versuch 12 ergibt sich, daß die sterilisierte Milch mit NH_3-Zusatz Nr. 1 bis 3 inkl. bei + 50° C entfärbte, während die Nr. 4 bis 9 ein 2stündiges Erwärmen auf diese Temperatur ohne bemerkbaren Einfluß ertrugen, aber alle bei der erhöhten Temperatur von + 70° C positiv reagierten. Bei der gekochten Milch zeigt sich dagegen bei allen Proben eine 2stündige Einwirkung von + 50° C wirkungslos. Bei + 70° C entfärben nur die vier ersten Proben und Nr. 2 bis 4 bedürfen dazu bereits einer mehr wie 1stündigen Einwirkung, während die Nr. 5 bis 9 erst bei + 90° C entfärbt werden, bei einer Temperatur also, die bei sterilisierter Milch gar nicht in Anwendung gekommen war.

In diesem Falle stand der ermittelte Ammoniakgehalt der gekochten Milch mit 0,408 mg für 20 ccm zwischen den Zusätzen von Nr. 6 bis 7.

Es dürfte aus diesem Versuche zweifellos hervorgehen, daß bei $^1/_2$stündigem Abkochen der Milch eine tiefergehende Beeinflussung der Milchbestandteile stattfand als bei dem langsamer ansteigenden und ruhiger verlaufenden Sterilisieren.

Bei den ersten Beobachtungen über die Entfärbung von MF durch sterilisierte Milch war es sehr auffallend, daß in weiten Grenzen wechselnde Reaktionszeiten gefunden wurden, und dies gab Veranlassung, die Gründe hierfür aufzusuchen.

Aus den vielfach modifizierten Beobachtungen mit und ohne thermostabilen Zusätzen dürfte sich möglicherweise ergeben, daß die Art und Höhe der Erhitzung der Milch und ihr natürlicher Gehalt an den wirksamen thermostabilen Stoffen die Länge der zur Entfärbung erforderlichen Zeitdauer bedingt. Wenigstens gelang es durch wechselnde, bis auf ein Minimum herabgehende Zusätze die Reaktion so zu gestalten, daß sie mit jenen in den unversetzten Kontrollproben gleich verlief.

Versuch 12.

8. I. 11.

Keimgehalt der Rohmilch nach $24^h = 28{,}800$ in 1 ccm Katalasegehalt nach $24^h = 3{,}2$ ccm Sauerstoff. Schardinger MF wird entfärbt in 5'. Ammoniakgehalt der gekochten Milch für 100 ccm = 2,04 mg, d. i. für 20 ccm = 0,408 mg.

a) Sterilisierte Milch je 20 ccm + 1 ccm MF.

1. + 7,5 mg NH_3 bei + 50° C entfärbt in $1^h 58'$
2. + 6,0 „ „ „ + „ „ „ $2^h 07'$
3. + 3,75 „ „ „ + „ „ „ $2^h 20'$

	2^h bei + 50° C ohne bemerkbaren Einfluß	sodann in ein Wasserbad von + 70° C entfärbt in weiteren
4. + 1,50 „ „		20'
5. + 0,75 „ „		24'
6. + 0,60 „ „		35'
7. + 0,375 „ „		40'
8. + 0,075 „ „		48'
9. Kontrollprobe ohne NH_3		50'

b) $^1/_2{}^h$ gekochte Milch.

	Ammoniakzusatz wie bei a)	2^h bei allen Proben bei + 50° C ohne bemerkbaren Einfluß	$1^h 30'$ auf 70° C ohne bemerkbar. Einfluß	sodann in Wasserbad von + 70° C entfärbt in weiteren
1.				30'
2.				„ „ „ $1^h 02'$
3.				„ „ „ $1^h 23'$
4.				„ „ „ $1^h 50'$
5.				sodann in ein Wasserbad auf + 90° C entfärbt in weiteren 10'
6.				„ „ „ 18'
7.				Nr. 7, 8 und 9 ganz gleichmäßig in 24' entfärbt
8.				
9.				

Daß schon durch das Pasteurisieren der Milch Änderungen stattfinden, zeigt uns Versuch 10. Dann hat aber auch A. Barillé[1]) festgestellt, daß bei diesem Prozesse schon von

[1]) A. Barillé, Über das Vorhandensein von Carbonophosphaten in der Milch und ihre Ausfällung durch das Pasteurisieren. Journ. de Pharm. et Chim. 1909, 30.

+ 50° C das gelöste Calciumcarbonophosphat zersetzt wird, unlösliche Teile sich ausscheiden und nur hauptsächlich Phosphorcaseinat in Lösung bleibt. Das Pasteurisieren der Milch bedeutet also eine teilweise Entmineralisierung und einen Verlust an Phosphorsäure. Also sind die rohe und die pasteurisierte Milch chemisch verschieden; weit größer noch wird der Unterschied zwischen diesen beiden und der wesentlich höher erhitzten sterilisierten und der $^1/_2{}^h$ gekochten Milch sein.

Um ein Bild über den natürlichen Ammoniakgehalt der Milch zu bekommen, wurden auf den sehr dankenswerten Vorschlag von Herrn Prof. Dr. Martin Hahn verschiedenartige Milchproben nach Nencki und Zaleski[1]) untersucht. Hierbei wird im Vakuum unter Kalkhydratzusatz das Ammoniak freigemacht, in $^n/_{10}$-H_2SO_4 aufgefangen und durch Titration die Ammoniakmenge bestimmt[2]). So gelangten laut folgender Aufstellung 4 Rohmilchproben verschiedenster Herkunft, eine pasteurisierte unbeimpfte Milch, 2 Proben $^1/_2{}^h$ gekochter Milch, eine ungeimpfte sterilisierte Milch und je 2 Proben geimpfter pasteurisierter und sterilisierter Milch zur Untersuchung. Die letzten 4 Proben wurden mit Reinzuchten geimpft, die ich gelegentlich meiner eingangs zitierten Arbeit (s. S. 102ff.) erhalten hatte und verschieden lange Zeit bei 37° bebrütet, um tunlichst verschiedenartige Stoffwechselprodukte zu erhalten.

1. 50 ccm frische, rohe Milch verbrauchten im Destillat 0,8 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 1,36 mg NH_3; also auf 100 ccm Milch 2,72 mg NH_3.

2. 50 ccm einer anderen frischen Milch verbrauchten im Destillat 0,3 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,51 mg NH_3, also auf 100 ccm Milch 1,02 mg NH_3. Diese Milch hatte in 1 ccm 71680 Keime, entfärbte MF in 5′.

3. 50 ccm Rohmilch vom 22. XI. 1910 hatten in 1 ccm 14700 Keime, entfärbte MF in 6′; Katalase in 24^h = 1,2 ccm

---

[1]) Nencki und Zaleski, Über Ammoniakbestimmungen in tierischen Geweben und Flüssigkeiten. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 36, 385.

[2]) Herrn Assistenten Vogel sage ich auch an dieser Stelle besten Dank für seine Mithilfe bei den Ammoniakbestimmungen.

Sauerstoff. Das Destillat aus 50 ccm verbrauchte 0,575 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,000977 NH_3, d. h. für 100 ccm Milch = 1,95 mg NH_3.

4. 50 ccm Rohmilch vom 23. XI. 1910 hatten in 1 ccm 53760 Keime, entfärbte Schardinger-MF in 4'; Katalase in 24^h = 2,6 ccm Sauerstoff. Das Destillat aus 50 ccm verbrauchte 0,355 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,000595 NH_3, d. i. für 100 ccm Milch 1,19 mg NH_3.

5. Pasteurisierte Gerbermilch vom 24. XI. 1910 hatte in 1 ccm 170 Keime. Das Destillat aus 50 ccm verbrauchte 0,31 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,000527 NH_3, d. i. für 100 ccm Milch = 1,054 mg NH_3.

6. Rohe, frische Milch, $^1/_2{}^h$ gekocht, verbrauchte im Destillat = 0,2 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,00034 g NH_3 für 50 ccm Milch = 0,68 mg NH_3 für 100 ccm.

7. Rohe, frische Milch, $^1/_2{}^h$ gekocht, verbrauchte im Destillat = 0,6 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,00102 g NH_3, für 50 ccm Milch = 2,04 mg für 100 ccm.

8. Keimfreie, sterilisierte Milch; 50 ccm verbrauchten im Destillat 0,43 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,000731 g NH_3, d. i. für 100 ccm Milch 1,462 mg NH_3.

9. Pasteurisierte Milch, geimpft mit Reduktase-Katalase-kultur Nr. 29 nach 5tägiger Bebrütung; 50 ccm verbrauchten 1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,0017 g NH_3, d. i. für 100 ccm Milch 3,4 mg NH_3.

10. Pasteurisierte Milch, geimpft mit Reduktase-Katalase-kultur Nr. 35 nach 6tägiger Bebrütung; 50 ccm verbrauchten 1,7 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,00289 g NH_3, d. i. für 100 ccm Milch 5,78 mg NH_3.

11. Sterilisierte Milch, geimpft mit Kultur Nr. 6a nach 7tägiger Bebrütung; 50 ccm verbrauchten im Destillat 1,2 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,00204 g NH_3, d. i. für 100 ccm Milch 4,08 mg NH_3

12. Sterilisierte Milch, geimpft mit Kultur Nr. 6b nach 8tägiger Bebrütung; 50 ccm verbrauchten 0,4 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,00068 g NH_3, d. i. für 100 ccm Milch 1,36 mg NH_3.

Ziehen wir aus den so erhaltenen Ammoniakzahlen aus den Nrn. 1 bis 8 inkl. die Mittelzahl, so ergeben sich für 100 ccm Milch im Durchschnitt 1,235 mg NH_3 und auf 20 ccm 0,247 mg. Diese Zahl liegt dann zwischen den bei den Versuchen 9 und 11 gemachten NH_3-Zusätzen in den Nrn. 7 und 8.

Die bei den Ammoniakermittelungen benutzten Kulturen Nr. 9 bis 12 inkl. dagegen durften nicht zu den Mittelzahlen herangezogen werden, da eine derartig behandelte Milch wohl nie für allgemeine Zwecke im bakteriologischen Laboratorium zum Sterilisieren verwendet wird; in unserem Falle handelte es sich nur darum, die gebildeten Ammoniakmengen zu ermitteln.

Daß aber außer NH_3 auch NaOH und Phosphate des Calciums und Natriums entfärbend auf MF einwirken, ist in den Versuchen 4 bis 7 in wechselnder Weise gezeigt worden und findet durch dieselben der in der erwähnten Arbeit von Bredig und Sommer befindliche Absatz 1 seine Bestätigung. Die Autoren sagen hier: „Die Schardinger-MF-Reaktion mit anorganischen Fermenten resp. die Reduktion von MF durch Metallkatalyse dürfte ein weiterer Beweis für die Möglichkeit der Mitwirkung anorganischer Körper sein, indem auch die kolloidalen Metallösungen eine in vieler Beziehung gleiche Wirkung auf das Schardingersche Reagens MF ausüben, wie das Enzym keimfreier ungekochter Milch." Auch die von Römer und Sames auf Seite 2 und 3 der eingangs zitierten Arbeit niedergelegte Mitteilung, „daß gekochte Milch MF nicht mehr entfärbt, solches aber nach Zusatz von 0,2 bis 0,3 ccm einer $1\,^0/_0$igen frisch bereiteten Ferrosulfatlösung prompt ausführe", muß wohl, wenn auch in dieser vorliegenden Arbeit nicht nachgeprüft, jedenfalls unzweifelhaft richtig sein.

Aus dieser eben genannten Arbeit sind noch einige Punkte hervorzuheben; Römer und Sames sagen (S. 5), daß sie bei ein und derselben Kuh häufig an direkt aufeinanderfolgenden Tagen das eine Mal prompt entfärbende, das andere Mal nicht entfärbende Milch fanden, und daß sie durch sog. Staumilch, die also längere Zeit im Euter gestanden hat, in der Regel keine Reaktion bekamen. Mit diesen Angaben stehen meine Erfahrungen leider in Widerspruch, ich habe mit frischer Milch immer positive Resultate erhalten, wenn auch aus den einzelnen Zitzen einer und derselben Kuh (s. S. 128 meiner Arbeit) sich Differenzen in der Reaktionsgeschwindigkeit von 7 bis 13′ zeigten. Ferner ergaben alle Milchproben, die von Schlachthaustieren stammten und bei denen fast immer eine Stauungsmastitis infolge des Nichtmelkens wahrscheinlich ist und auch häufig von dem die Proben selbst entnehmenden Tierarzte konstatiert

wurde, stets die Reaktion. Auch die von Römer und Sames aufgestellte These, daß die Anfangsmilch (S. 6) gar nicht oder nur ganz unvollständig entfärbe, trifft bei meinen Beobachtungen nicht zu, da hierbei stets nur mit Anfangsmilch Versuche gemacht wurden und niemals ausgemolken wurde. Die Untersuchungen von K. Schern[1]), nach dem die frische Milch altmilchender Kühe entfärbt, die frische Milch frischmilchender dagegen nicht, besonders wenn ein Kalb längere Zeit am Euter gesogen hat, sprechen allerdings im letzteren Falle für Römer und Sames; es wäre aber doch ein eigenartiges Zusammentreffen, wenn bei ihren Untersuchungen nur solche Milch zur Prüfung gekommen wäre, außerdem steigt die Menge des die Reaktion auslösenden Fermentes vom Tage der Geburt wieder bis zum normalen Gehalt an.

Römer und Sames legen auf den Umstand, daß die Endmilch bedeutend fettreicher wie die Anfangsmilch ist, beim Eintreten der Schardinger-Reaktion großen Wert und finden einen weitgehenden Parallelismus zwischen Fettgehalt einerseits und Reaktion andererseits, „jedoch sei dieser Parallelismus kein vollständiger". Indem die beiden Forscher auf S. 8 auch eine Untersuchung anführen, bei der bei sehr hohem Fettgehalt eine recht verzögerte Reaktion eintrat, sagen sie, „wir dürfen also in Übereinstimmung mit anderen Autoren nicht etwa annehmen, daß das Fett selbst der Träger der reduzierenden Wirkung ist". Da aus ihren Versuchen aber mit Sicherheit hervorgeht, daß die Endmilch rascher als die Anfangsmilch reagiert, diese energischere Reaktion aber höherem Fettgehalt entspreche, so sei zu folgern, daß unter den gleichen Bedingungen, unter denen die Milchdrüse reichlich Fett ausscheidet, es auch zur reichlicheren Ausscheidung der MF-Reduktase komme. Zum Schlusse der Arbeit erwähnen auch sie, daß in gekochter Milch ein geringer Zusatz von NaHO ebenso wie Kalkwasser die MF-Reaktion auftreten läßt.

In der gleichfalls eingangs genannten Arbeit von Th. Sames wird auf Grund des hier vorstehenden letzten Satzes der theoretisch berechtigte Einwand erhoben, daß erst die Oxydasereaktion (Guajakreaktion und Guajak + H_2O_2-Reaktion) ent-

[1]) K. Schern, Beobachtungen über die Schardinger-Reaktion der Milch. Diese Zeitschr. 18, 261 bis 284.

scheide, ob das Nahrungsmittel, in unserem Falle die Milch, roh oder erhitzt war und die Benzidinreaktion dann, wenn das Nahrungsmittel nicht durch Formaldehyd konserviert war. Es dürfte jedoch ein sehr gewiegter Kenner aller einschlägigen Verhältnisse dazu gehören, um auf diese Weise eine gekochte Milch zu reaktivieren und als Rohmilch in den Handel zu bringen. Ein erfahrener Bakteriologe wird durch Keimzählung Beweise für solche Manipulationen erbringen können und vor allen Dingen in kürzester Zeit durch die Prüfung auf Katalase den Beweis erfolgten Zusatzes feststellen. Während Rohmilch, auch wenn nur geringe Bakterienmengen vorhanden sind, in 1^h meßbare Sauerstoffmengen ausscheidet, bleibt eine sterilisierte, aber auch eine nur aufgekochte Milch unbeeinflußt. Nun setze man zu einer solchen Milch diejenigen NaOH-Mengen, die nach Römer und Sames enzymatische Wirkungen vortäuschen und die MF-Reaktion auslösen, dann findet man, daß keine Katalasebildung eintritt und somit keine Rohmilch vorliegt. Nach meinen Versuchen (Versuch 3) führt ein Zusatz von 20 mg NaOH zu 20 ccm sterilisierter Milch bei $+50°$ C die Entfärbung von MF in etwa 5′ herbei; dieselbe NaOH-Menge habe ich den gleichen Mengen sterilisierter Milch zugesetzt und solche dann der Katalaseprüfung mit absolut negativem Erfolg unterzogen. Nach 24^h hatte sich keine Spur von Sauerstoffentwicklung ergeben.

Auch in dem nach Rothenfußers[1]) Vorschlag durch Bleiacetat hergestellten Milchserum kann man durch Zusatz der von ihm empfohlenen Paraphenyldiaminchlorhydrat-Guajacollösung $+ H_2O_2$ die Zerstörung resp. das Vorhandensein der Enzyme nachweisen. So wurden auch noch mehrere Röhrchen sterilisierter Milch in schon angegebenem Verhältnisse mit wechselnden Mengen von NaOH versetzt und mit Bleiacetat ausgefällt; im Filtrate war in keinem Falle eine sofortige Reaktion bemerkbar, erst nach mehreren Minuten traten Spuren von Färbung auf. Wie weit die Feinheit dieser Reaktion geht, wird dadurch bewiesen, daß Zusatz von 2% roher Milch zu gekochter oder sterilisierter bereits in 1′ positive Reaktion

[1]) Rothenfußer, Über den Nachweis von Fermenten unter besonderer Berücksichtigung der Milch. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 16, 63, Heft 1 u. 2, 1908.

hervorruft, die beim Stehen an Intensität zunimmt. Bleibt Serum aus gekochter Milch länger in Beobachtung, dann tritt allerdings nach 10′ auch Färbung ein, aber lange nicht mit jener Stärke wie bei Zusatz von 2% Rohmilch.

Das in Vergleich gezogene Storchsche Reagens Paraphenylendiaminchlorhydrat + H_2O_2 blieb bezüglich der Empfindlichkeit gegen die Rothenfußersche Reaktionsmethode weit zurück.

Um über die maximale Leistungsfähigkeit der zuletzt genannten Methode einen Maßstab zu bekommen, wurde nachfolgende Beobachtung angestellt.

Versuch 13.

a)	Serum	aus	sterilisierter	Milch	+	Rothenfußers	Reagens	in	5′	deutliche Reaktion
b)	„	„	3mal aufgekochter	„	+	„	„	„	5′	„ „
c)	10 ccm	Ser.	aus steril.	Milch	+0,2 ccm	Rohmilchserum	+	Rothenfußer		sofort deutliche Reaktion
d)	10 „	„	„	„	+0,15 „	„	+	„		
e)	10 „	„	„	„	+0,1 „	„	+	„		
f)	10 „	„	„	„	+0,08 „	„	+	„		
g)	10 „	„	„	„	+0,05 „	„	+	„		in 1′ deutlich
h)	10 „	„	„	„	+0,02 „	„	+	„		„ 1½′ „
i)	10 „	„	„	„	+0,01 „	„	+	„		„ 2′ „

Nach i ist es also möglich, in 1000 Teilen Serum aus sterilisierter Milch noch einen Zusatz von einem Teil Rohmilchserum in 2′ zweifellos nachweisen zu können.

Um Täuschungen vorzubeugen und der Vollständigkeit halber muß hier noch angeführt werden, daß das Rothenfußersche Reagens beim längeren Stehen ohne Zusatz von H_2O_2 in Flüssigkeiten wie sterilem Wasser und physiologischer Kochsalzlösung in 24h eine Farbänderung durch Oxydation vermöge des Luftsauerstoffs erleidet; ebenso zeigt Serum aus sterilisierter Milch ohne H_2O_2 bei gleichem Zusatz eine deutliche Reaktion, die in 24h sich bis zum kräftigsten Violett steigert. Auch eine andere Beobachtung sei noch erwähnt; einer gekochten Milch, die bei der Fällung nur langsam das Casein abschied, war etwas mehr Bleiacetat als das Rothenfußersche Maximum zugeführt worden, und da zeigte sich nach dem Filtrieren, daß, entgegen früherem Befunde bei normalem Bleiacetatzusatz, das überschüssige Bleiacetat als Katalysator an Stelle des zerstörten Enzyms wirkte und bei der Unter-

suchung des Serums aus gekochter Milch auf Katalase in kurzer Zeit kräftige Sauerstoffentwicklung unter Ausscheidung von Bleioxyd auftrat.

Weitere Versuche zeigten, daß mit Erhöhung des Bleiacetatzusatzes auch eine Steigerung der katalytischen Wirkung eintrat, aber bei vorschriftsmäßiger Serumausscheidung aus gekochter oder sterilisierter Milch sich keine Katalase entwickelt.

Es schien nun auch interessant zu sein, die Einwirkung von Serum aus 3mal aufgekochter Milch auf MF und die früher gemachten Zusätze von NaOH und Milchzucker zu prüfen.

Versuch 14.

Temperatur + 50° C.

a)	20 ccm	Serum	aus	gekocht.	Milch	+ 1 ccm	MF	in 1 h	keine Änderung	
b)	20 „	„	„	„	„	+ 1 „	„	+ 0,02 g NaOH	in 2′	entfärbt
c)	20 „	„	„	„	„	+ 1 „	„	+ 0,01 g „		
d)	20 „	„	„	„	„	+ 1 „	„	+ 0,01 g „ + 1 g Milchzucker	in 2′	entfärbt
e)	20 „	„	„	„	„	+ 1 „	„	+ 0,005 g NaOH	in 45′	entfärbt
f)	20 „	„	„	„	„	+ 1 „	„	+ 0,005 g „ + 0,5 g Milchzucker	„ 40′	„
g)	20 „	„	„	„	„	+ 1 „	„	+ 0,001 g NaOH	1 h	ohne Einwirkung
h)	20 „	„	„	„	„	+ 1 „	„	+ 0,001 g „ + 0,1 g Milchzucker	1 h	ohne Einwirkung

Hier findet sich Ähnlichkeit mit den bei Milch unter gleichen Verhältnissen erzielten Resultaten; steigerte man die Temperatur auf + 70° C, dann trat bei e) Entfärbung in 4′ und bei f in 2′ ein, also auch hier wieder günstige Beeinflussung der Reaktion bei gleichzeitigem Zusatz von NaOH und Milchzucker.

Die starken Verdünnungen bei g) und h) aber blieben auch bei + 70° C während $^1/_2$ h unbeeinflußt.

Es erübrigt noch die Feststellung des Verhaltens verschieden alter Lösungen von MF; zu diesem Zwecke stand eine am 10. XI. 1909, eine zweite am 20. VI. 1910 und eine dritte am Tage des Versuches, den 19. XI. 1910 hergestellte, zur Verfügung. Die Lösung vom 20. VI. 1910 stand einige Tage vorher öfters mit abgenommenem Stöpsel absichtlich da, um eventuell eine Verdunstung herbeizuführen.

Das Ergebnis war folgendes:

Rohe	Milch	+	Lösung	1	bei	50° C	entfärbt	in	3′
„	„	+	„	2	„	„	„	„	4′
„	„	+	„	3	„	„	„	„	2′
Pasteurisierte	„	+	„	1	„	„	„	„	24′
„	„	+	„	2	„	„	„	„	28′
„	„	+	„	3	„	„	„	„	22′

Es ergibt sich hieraus, daß das Alter der MF innerhalb Jahresfrist bei geschlossen gehaltenem Gefäß zu keinen wesentlichen Differenzen führt, da die Unterschiede zwischen 1 und 3 sehr geringe sind und die bei Lösung 2 bestehenden Verschiedenheiten wohl durch die absichtlich herbeigeführte Verdunstung von Formaldehyd bedingt sind.

Die Betrachtungen über das Wesen der Schardingerschen Reaktion können nicht abgeschlossen werden, ohne ein Eingehen auf die kürzlich erschienenen Arbeiten von Gramenitzki[1]) und Kulpsohn[2]). Nach einleitenden Worten über die Zerstörbarkeit der pflanzlichen Fermente bei + 80° C, der tierischen bei ca. 70° C, wird mitgeteilt, daß Kulpsohn bei der Oxydase des Rettichs sehr eigenartige und interessante Eigenschaften aufgefunden habe, die auf eine Regeneration des Enzyms nach dem Kochen schließen lassen. Er fand, daß die Peroxydase und die Oxydase des Rettichs, die durch Kochen ihre spezifischen Eigenschaften schon verloren hatten, dieselben nach Stehen an der Luft wiedergewannen, und zwar konnte dies nicht nur nach Erhitzung auf 100° C, sondern auch nach 115° C beobachtet werden. Diese Feststellung veranlaßte zu der neuen Frage, inwieweit diese Eigenschaft allgemein sei und ob sie auch auf andere typische Fermente, z. B. auf die hydrolytischen, sich verbreite. Zu den Versuchen wurde Takadiastase, Pankreatin und Maltin (S. 288) verwendet. Ohne genauer auf die Versuche einzugehen, sei noch erwähnt, daß nach den Verfassern die Regeneration bei gewöhnlicher Temperatur beginnt und verhältnismäßig langsam während eines Tages und länger steigt und vollständiger als bei höherer Temperatur wird, daß ferner bei Takadiastase die Temperatur von + 40° C einen großen und günstigen Einfluß ausübt.

---

[1]) Gramenitzki, Physiol. Chemie (Hoppe-Seyler), 69, H. 3/4, 1910.
[2]) Kulpsohn, Dissertation, Petersburg 1908.

Die in den erwähnten Arbeiten niedergelegten Befunde veranlaßten eine Prüfung der Milch in dieser Hinsicht, und besonders regten sie zu Versuchen mit Schardingers MF an.

In einem Kolben wurde ein Quantum frischer Rohmilch mit Paraffinöl überschichtet und zum Aufkochen gebracht; etwa die Hälfte der Milch wurde nach teilweisem Abkühlen unterhalb der Paraffinschicht in ein geräumiges, sterilisiertes, breites Glasgefäß übergesogen und unter Watteverschluß zur Sauerstoffaufnahme während 24^h häufig bei Zimmertemperatur mit Luft geschüttelt. Der andere Teil blieb unter der Paraffinschicht ruhig während der gleichen Zeit bei gleicher Temperatur stehen.

Versuch 16.

	a) + 1 ccm MF	b) + 1 ccm MF + 0,02 g NaOH	c) + 1 ccm MF + 0,02 g NaOH + 2 g Milchzucker
1. Milch aufgekocht unter Paraffin, 24^h stehend, je 20 ccm	bei + 50° C innerhalb 1^h keine Entfärbung		
	sodann auf 70° C		
	a) in 1^h 55′ entfärbt	b) in 55′ entfärbt	c) in 28′ entfärbt
2. Milch unter Paraffin aufgekocht, abgesogen und dann während 24^h häufig mit Luft geschüttelt, je 20 ccm	bei 50° C		
	a) 1^h ohne Einfluß	bei b) und c) begann Aufhellung nach 20′, blieb aber dann stehen	
	sodann auf + 70° C		
	a) in 1^h 45′ entfärbt	b) in 32′ entfärbt	c) in 15′ entfärbt

Aus diesem Versuche ist zu ersehen, daß die bei Gegenwart gewisser Luftmengen geschüttelte Milch gegenüber der bei gleicher Temperatur unter Paraffin unberührt gebliebenen Milch, also bei Luftabschluß, tatsächlich bei + 70° C eine erhöhte Reaktionsfähigkeit zeigte. Um nun zu prüfen, ob diese Differenzen weiter steigen würden, bleibt Milch I ruhig unter Paraffin stehen, während Milch II 2 Tage lang im Schüttelapparate mäßig bewegt wurde.

Dieser Versuch bringt teilweise ein anderes Verhalten. Bei + 50° C ist der Befund allerdings derselbe wie bei Versuch 17. Dagegen zeigen sich bei + 70° C wesentliche Unterschiede, die vorläufig nicht erklärbar sind. Die nach 3 Tagen

ermittelten Säuregrade (Soxhlet-Henckel) sind in beiden Proben fast gleich; die geringe Differenz von 0,2° kann wohl keinen Grund für das verschiedenartige Verhalten gegenüber den chemischen Reagenzien abgeben. Das Konstantbleiben des Säuregehaltes beweist jedenfalls, daß vor dem Aufkochen vorhandene Säurebildner zerstört waren. Umgekehrt müssen wir aus der Verlängerung der Entfärbungszeiten annehmen, daß auch keine Alkalibildner, welche die Reaktion beschleunigt hätten, vorhanden sind. Die großen Unterschiede bei Milch I und II sind jedenfalls sehr auffallend, um so mehr als bei I die Entfärbungsdauer bei b) und c) noch zurückgegangen ist, während sie bei II bei b) und c) ansteigt.

Versuch 17.

	a) + 1 ccm MF	b) + 1 ccm MF + 0,02 g NaOH	c) + 1 ccm MF + 0,02 g NaOH + 2 g Milchzucker
Milch I wie bei Versuch 16. Säuregrade nach 3 Tagen = 6,6°	bei + 50° C nach 1h keine Entfärbung		
	sodann auf + 70° C gebracht		
	a) nach 5h nicht entfärbt	b) in 1h 15′ entfärbt	c) in 40′ entfärbt
Milch II wie bei Versuch 16. Säuregrade nach 3 Tagen = 6,8°	bei + 50° C innerhalb 1h keine nennenswerte Änderung		
	bei + 70° C		
	a) in 5h entfärbt	b) und c) ganz gleichmäßig in 25′ entfärbt	

Einige Tage später wurde der Versuch in gleicher Weise wiederholt, nur wurde nicht mit dem Apparate, sondern, wie bei Versuch 16, während 24h öfters mit der Hand geschüttelt. Desgleichen verblieben I und II immer bei Zimmertemperatur. Da die eigene Erfahrung und diejenige anderer Autoren gezeigt hat, daß die Temperatur von + 70° C am gleichmäßigsten einwirkt, so wurde die Beobachtung bei 50° C unterlassen, dagegen noch die von + 90° C zugezogen. Jedesmal wurde direkt auf diese Temperaturen eingestellt. Es wurden zwei Versuchsreihen ausgeführt, deren erste 24h nach dem Aufkochen folgte und deren zweite 48h später stattfand.

Gleichzeitig angestellte Keimzählung ergab nach 48h von I in 1 ccm = 20 Keime und von II in 1 ccm = 30 Keime.

Katalase in beiden Proben nach $24^h = \varnothing$.

Oxydasereaktion in beiden Proben nach $24^h = \varnothing$.

Peroxydasereaktion gleichmäßig in beiden Proben nach 1^h nur Spuren, die nach 24^h kräftiger wurden, eine Erscheinung, wie sie jede sterilisierte, vollständig keimfreie Milch zeigt.

Säuregrade von Milch I = 7,2°,
„ „ „ II = 7,3°.

Versuch 18.

Temperatur + 70° C.

	a) + 1 ccm MF	b) + 1 ccm MF + 0,02 g NaOH	c) + 1 ccm MF + 0,02 g NaOH + 2 g Milchzucker
Milch I gekocht und unter Paraffin ruhig gestanden	1^h 15′ ohne Einfluß	in 1^h entfärbt	in 1^h 5′ entfärbt
	nach weiteren 24^h ruhigen Stehens wiederholt		
	1^h 40′ ohne Einfluß	in 1^h 20′ entfärbt	in 55′ entfärbt
Milch II gekocht und geschüttelt, nachdem sie vom Paraffin getrennt war	1^h 15′ ohne Einfluß	in 1^h 15′ entfärbt	in 1^h 5′ entfärbt
	nach häufigem weiterem Schütteln während 24^h		
	nach 1^h 40′ etwas heller geworden	in 1^h 10′ entfärbt	in 35′ entfärbt

Temperatur + 90° C (direkt).

Milch I wie oben	in 45′ entfärbt	in 2′ entfärbt
Milch II wie oben	in 50′ entfärbt	in 3′ entfärbt

Sterilisierte Milch aus unserem Vorrat wurde bei + 90° C + 1 ccm MF in 20′ entfärbt.

Die Ergebnisse aus diesem Versuche 18 sind zwar etwas einheitlicher, aber es bestehen doch noch genügend große Unterschiede.

Um die schon früher erwähnte Möglichkeit, daß beim raschen Aufwallen und Aufkochen der Milch eine energischere Beeinflussung der wichtigsten Bestandteile und besonders der Eiweißkörper im Gegensatze zu dem viel allmählicheren Er-

hitzen beim Sterilisieren stattfinde, zu prüfen, unterzog ich 3 Röhrchen unseres Vorrates an sterilisierter Milch der Einwirkung auf MF bei + 90° C. Die Entfärbung war bei allen dreien gleichmäßig in 19 bis 20′ eine vollkommene, während bei derselben Temperatur die Milch I und II 45′ resp. 50′ gebrauchte, also mehr als die doppelte Zeit. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß durch Sterilisierung die Milch weniger tiefgehend beeinflußt wird als durch das Aufkochen und Aufwallenlassen.

Am 6. XII. 1910 wurde der Versuch unter gleichen Verhältnissen wiederholt, nur wurde Milch II 1h lang im Apparat geschüttelt und sofort nach dem Erkalten, also am Tage des Empfanges, die Untersuchung ausgeführt.

Die Aussaat am Empfangstage ergab

für Milch I in 1 ccm nach 48h = 15 Keime
„ „ II „ 1 „ „ 48h = 20 „

Versuch 19.

	+ 50° C	+ 70° C	+ 90° C
Milch I unter Paraffin	innerhalb 2h 15′ keine Beeinflussung sichtbar		
a) + 1 ccm MF		2h 15′ ohne Einfluß	in 42′ entfärbt
b) + 1 ccm MF + 0,002 g NaHO		in 35′ entfärbt	beim Erreichen von + 88° entfärbt
c) + 1 ccm MF + 0,002 g NaHO + 2 g Milchzucker		in 25′ entfärbt	beim Erreichen von + 87° entfärbt
Milch II geschüttelt			
a) wie oben		2h 15′ ohne Einfluß	in 47′ entfärbt
b) wie oben		in 1h entfärbt	bei 90° sofort entfärbt
c) wie oben		in 35′ entfärbt	beim Erreichen von 87° entfärbt

Nach 24stündigem Stehen von Milch I und II wurden abermals Aussaaten gemacht, die bei I nach 48h in 1 ccm 150 Keime und bei II nach 48h in 1 ccm 80 Keime ergaben.

Katalase bei I und II nach 24^h = ∅.

Säuregrade (Soxhlet-Henckel)

von Milch I nach 24stünd. Stehen bei $+15°$ = 6°,

„ „ II „ „ „ „ $+15°$ = 6,2°.

Es fand eine nochmalige Prüfung bei $+70°$ auf das Verhalten zu MF und den beiden Zusätzen von NaOH und Milchzucker statt.

Versuch 20.

$+70°$ C.

Milch I	Milch II
a) 2^h 30′ ohne Einfluß b) entfärbt in 55′ c) en färbt in 23′	a) 2^h 30′ ohne Einfluß b) entfärbt in 1^h 5′ c) entfärbt in 28′

Beim Vergleichen der beiden letzten Versuche zeigt sich gleichfalls eine gewisse Annäherung der Ergebnisse, und zwar besonders bei $+70°$ C, aber immerhin bleiben schwer erklärbare Unterschiede bestehen, die nach den Feststellungen der Keimzahl, der Katalase und der Säuregrade kaum auf die Einwirkung der in sehr geringer Menge vorhandenen Bakterien zurückzuführen sein dürften. Der wesentlichste Einfluß ist wohl dem aufgenommenen Luftsauerstoff zuzuschreiben; der Grund aber, der den Sauerstoff einmal die Entfärbung fördernd, das andere Mal hemmend auftreten läßt, ist noch zu ermitteln. Keinesfalls aber haben wir es in unserem Falle mit einer Regeneration von Enzymen zu tun, da stets die Reaktionen auf Oxydase, Peroxydase und Katalase negativ ausfielen.

Als Resultat der vorliegenden Untersuchungen ergibt sich:

1. Keimfreie und keimhaltige unerhitzte Milch sowie thermostabile Körper entfärben sowohl in Gemeinschaft als jedes für sich allein bei $+45$ bis $50°$ C Schardingers MF in wenigen Minuten.

2. Bei MF ist das Formaldehyd auch durch eine äquivalente Ameisensäuremenge zu ersetzen; diese letztere Lösung braucht jedoch fast stets wesentlich längere Zeit zur positiven Reaktion. Beobachtete Ausnahmen finden sich in meinen Versuchen nur bei I in Nr. 3 und bei II in Nr. 3.

3. Die Entfärbung von MF und MA in sterilisierter Milch beruht auf der Einwirkung thermostabiler Körper. Das Alter resp. der Frischezustand der Milch scheint, sofern die Milch keimfrei bleibt, ohne Belang, wie auch eine gut verschlossene MF-Lösung sich mindestens 1 Jahr lang ungeändert hält.

4. Sterilisierter Milch zugesetzte geringe Mengen von NaOH, NH_3 und Phosphaten beschleunigen die Reaktion wesentlich, ganz besonders aber, wenn gleichzeitig Michzucker zugefügt wurde. Milchzucker ohne Alkalizusatz hat nur geringe fördernde Wirkung (siehe Versuch 3 d).

5. Reine Milchzuckerlösungen ohne Alkalizusatz üben weder auf MF noch MA eine Einwirkung aus (siehe Versuch 4 Nachsatz).

6. Erhöhte Temperatur wirkt immer reaktionsfördernd.

7. Durch Abstufung der Zusätze gelang es, die natürliche Grenze für dieselben zu finden, derart, daß Kontrollmilch ohne Zusätze gleichzeitig mit den versetzten Proben entfärbte.

8. Rohe unerhitzte, pasteurisierte, sterilisierte und aufgekochte Milch wirken sehr verschiedenartig bezüglich der zur Entfärbung erforderlichen Zeitdauer.

9. Diese verschiedenartige Einwirkung dürfte einerseits durch die bei + 50° C beginnende Entmineralisierung der Milch, dann durch die bei 65 bis 69° anfangende Enzymschädigung und schließlich durch die bei noch höheren Temperaturen unvermeidliche Zersetzung der Eiweißkörper begründet sein.

10. Sehr geringe Mengen von zugesetztem NH_3, wie solche als Mittelzahl aus 9 verschiedenartigen Milchproben ermittelt worden sind, scheinen bedeutungslos zu sein.

11. Die Untersuchungen von Römer und Sames haben bezüglich der Einwirkung anorganischer Fermente resp. thermostabiler Körper auf die MF-Reaktion erhitzter Milch gleiche Resultate ergeben. Bezüglich derselben Reaktion bei unerhitzter Milch aber stehen die vorliegenden Untersuchungen mit denen ersterer leider in Widerspruch.

12. Der von Sames erhobene Einwand, daß durch Zusatz von Basen zu gekochter Milch ein Rohzustand der-

selben vorgetäuscht werden könne, ist theoretisch begründet, dürfte aber für die Praxis hinfällig sein.

13. Die Rothenfußersche Reaktionsmethode ist sehr genau und gibt noch Zusätze von 1 Teil Rohmilch auf 1000 Teile gekochter Milch an. Die Schardingersche Methode jedoch, die nur Rohmilch von gekochter Milch rasch unterscheiden will, ist, da hierbei die Darstellung von Serum wegfällt, für die gewöhnlichen Zwecke des Milchbakteriologen durch die festgestellten großen Zeitunterschiede, die sich bei Untersuchung von roher und erhitzter Milch ergeben, nach wie vor als geeignet zu betrachten.

14. Die Beobachtungen von Gramenitzki und Kulpsohn haben, im vorliegenden Falle auf Milch übertragen, keine Regeneration der Enzyme ergeben.

Beziehungen zwischen höheren Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in verschiedenen Entwicklungsperioden des Organismus.

I. Mitteilung.

Von

A. Costantino.

(Aus dem Institut für experimentelle Physiologie der K. Universität Neapel.)

(Eingegangen am 16. April 1911.)

Eine quantitative Bestimmung der Beziehung höherer Fettsäuren zu den unverseifbaren Substanzen mit gleichzeitiger Bestimmung der Jodzahl der Fettsäuren in toto beim Hundefötus und bei neugeborenen Hunden hielt ich nach Erscheinen der Arbeit von Kumagawa und Suto[1]) für wünschenswert. Die von diesen Forschern angestellte sorgfältige Untersuchung war für mich von großem Nutzen für die Lösung der beiden Aufgaben.

Aus der Arbeit von Kumagawa und Suto ergibt sich, daß die Methoden von Rosenfeld[2]) und Bogdanow[3]) mit Alkohol-Chloroform-Extraktion, bzw. mit Alkohol-Äther zu beträchtlichen Fehlern mit 17 bis 40% und zu einem Verlust von 10% an höheren Fettsäuren führen.

---

[1]) M. Kumagawa und K. Suto, Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst der Kritik einiger gebräuchlicher Methoden. Diese Zeitschr. 7, 212, 1908.

[2]) G. Rosenfeld, Zur Methodik der Fettbestimmung. Centralbl. f. inn. Med. 21, Nr. 33, 833, 1900.

[3]) E. Bogdanow, Neue Methode der Fettbestimmung in tierischen Substanzen. Arch. f. d. ges. Physiol. 68, 431, 1897.

Die Methoden von Pflüger[1]) und Dormeyer[2]), die diese Verluste mittels vorausgehender (Pepsin-HCl) Verdauung zu vermeiden suchen, erhöhen zu viel den Wert des Extrakts, indem sie 16 bis 40% Unreinigkeiten in dem Extrakt verursachen. Die Methoden von Soxhlet[3]) (Äther) und Glikin[4]) (Petroläther) führen, obwohl sie geeignet sind, reinere Extrakte zu liefern, zu einem Verlust von 10% an höheren Fettsäuren. Endlich arbeitet die Methode von Liebermann-Székely[5]), obgleich sie bessere Resultate ergibt, dennoch mit einem Verlust von 9% an höheren Fettsäuren, indem sie gleichzeitig infolge Bildung von niederen Fettsäuren, die von nicht fetten Substanzen stammen, eine Zunahme verursachen. Kumagawa und Suto gelangten, von der Kritik dieser Untersuchungsmethoden ausgehend, zu dem Resultat, daß sie die auf der Verseifung beruhende Methode praktisch und genau gestalten konnten.

Eben diese Methode befolgte ich bei Untersuchungen am Brei vom Fötus des Hundes, worin das Fett während der fötalen Periode nicht sichtbar wird und in dem, wie man vielleicht behaupten darf, die Fettsäuren sich in komplizierteren Verbindungen vorfinden.

Die von mir befolgte Methode läßt sich so zusammenfassen:

Die Föten oder neugeborenen Hunde wurden zerrieben, in homogenen Brei verwandelt und dann bei einer Temperatur von 60 bis 70° in einem Strom von Leuchtgas getrocknet, das durch Schwefelsäure und Kaliumhydrat gereinigt war. Die trockene Masse wurde pulverisiert und ein Teil der Verseifung ausgesetzt, ein anderer dagegen auf einem Wageglöschen im leeren Raum mit Schwefelsäure bis zum Austrocknen gelassen. Die beiden

---

[1]) E. Pflüger, Über die Entstehung von Fett aus Eiweiß im Körper der Tiere. Arch. f. d. ges. Physiol. 51, 277, 1891.

[2]) C. Dormeyer, Vorläufige Mitteilung: Die quantitative Bestimmung von Fett in tierischen Organen. Arch. f. d. ges. Physiol. 61, 341, 1895. Originalmitteilung: Die quantitative Bestimmung von Fetten, Seifen und Fettsäuren in tierischen Organen. Ebenda 65, 90, 1896.

[3]) Soxhlet, Gewichtsanalytische Bestimmungen des Milchfettes. Dingl. Polyt. J. 232, 461.

[4]) W. Glikin, Untersuchungen zur Methode der Fettbestimmung in tierischem Material. Arch. f. d. ges. Physiol. 95, 107, 1903.

[5]) L. v. Liebermann und S. Székely, Eine neue Methode der Fettbestimmung in Futtermitteln, Fleisch, Kost usw. Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 360, 1898.

Teile wurden gleichzeitig abgewogen. Die Verseifung geschah auf folgende Weise: 10 bis 18 g trockene Substanz wurden mit 20%igem Natriumhydrat vermengt und 2 bis 3 Stunden in einem von einem großen umgekehrten Trichter bedeckten Gefäße im Wasserbad gelassen. Hierdurch wird die Temperatur innerhalb des Trichters überall auf 100° C erhöht. Die bräunliche, flüssige, noch warme Masse wurde in einen Scheidetrichter gegossen und mit etwas warmem Wasser nachgespült. Hierauf wurden die Fettsäuren mittels 20%iger Salzsäure aus den Seifen dargestellt. Nach tüchtigem Schütteln und erfolgter Abkühlung schüttelte ich mit Äther aus. Nach Abtrennung des im Äther Gelösten wurde der braune Rückstand zweimal mit Äther geschüttelt, zuletzt in Alkali wieder aufgelöst und mit dem wässerigen Teil vereinigt; dann wurde eine neue Extraktion ausgeführt (200 ccm ganz reiner Äther). Die gesamten ätherischen Extrakte ließ ich auf dem Wasserbad verdunsten; den Rückstand behandelte ich wieder mit absolutem Äther. Hierauf filtrierte ich durch Asbest, ließ wieder verdunsten und behandelte den im Leuchtgasstrom bei 45° getrockneten Rückstand mit Petroläther. Nach einiger Zeit filtrierte ich und erhielt so eine Auflösung, welche die Fettsäuren und die unverseifbaren Substanzen enthielt. Die Extrakte erschienen gelb bis rotbraun gefärbt.

Die Trennung der beiden Teile nahm ich auf folgende Weise vor:[1])

Die in den Scheidetrichter gebrachte Ätherlösung wurde mit 5%iger alkoholischer Sodalösung geschüttelt, um die Fettsäuren in Seifen zu verwandeln. Durch Wasserzusatz setzte ich den Gehalt an Alkohol auf 50% herab, und erhielt so eine deutliche Trennung in zwei Schichten. Nachdem die Schicht von Petroläther entfernt war, schüttelte ich sie einmal mit 50%igem Alkohol, um sie von ev. übergegangenen Seifenspuren zu befreien, und sammelte die Extrakte in einem Kolben. Den die Seifen enthaltenden wässrig-alkoholischen Teil schüttelte ich wieder zweimal, indem ich dieselben vorigen Manipulationen wiederholte (ca. 200 ccm Petroläther).

Die vereinigten, verdunsteten, zuerst im Leuchtgasstrom bei 45° und dann im Exsiccator getrockneten, im Petroläther gelösten Substanzen lieferten mir den unverseifbaren Teil. Aus der wässrig-alkoholischen Lösung der Seifen, nach Konzentrieren im Wasserbad und Sättigung der Lösung mit NaCl, wurden mit HCl-Lösung die Fettsäuren ausgeschieden. Ich entfernte sie durch Äther indem ich die Operation viermal wiederholte (mit ca. 180 ccm Äther). Nach Verdunsten des Äthers und Trocknen des Rückstandes bei 45° im Leuchtgasstrom und hierauf im Exsiccator mit H_2SO_4 im leeren Raum erhielt ich den Betrag an Fettsäuren.

An diesen Fettsäuren führte ich die Bestimmung der Jodzahl nach der Hüblschen Methode[2]) aus.

Im folgenden sind die Analysen wiedergegeben.

---

[1]) M. Hönig und G. Spitz, Untersuchung von Gemengen von unverseifbaren und verseifbaren Fetten. Zeitschr. f. anal. Chem. 31, 477, 1892.

[2]) Hübl, Journ. Soc. chem. Ind. 1884, 641.

1. Versuch.

Gewicht der Hündin 7,872 kg; Mittelgewicht einer jeden Frucht 23 g (Zahl der gewogenen Früchte 7).

I. 12,8030 g trockenes Pulver ergaben 0,8738 g Fettsäuren.

Dies ergibt als Prozent des trockenen Pulvers:

$$12{,}8030 : 0{,}8738 = 100 : x$$

$$x = 6{,}82.$$

II. 12,8030 g trockenes Pulver ergaben 0,1970 g unverseifbare Substanzen.

Als Prozent des trockenen Pulvers ergab dies:

$$0{,}1970 : 12{,}8030 = x : 100$$

$$x = 1{,}53\,\%.$$

III. Berechnen wir den Gehalt an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in Prozent des erwähnten Gemenges, so erhalten wir: (0,8738 + 0,1970 = 1,0708)

$$1{,}0708 : 0{,}8738 = 100 : x$$

$$x = 81{,}60\,\%\ \text{Fettsäuren.}$$

Durch Subtraktion: 100 — 81,60 = 18,40 % unverseifbare Substanzen.

IV. 0,4433 g Fettsäuren verbrauchten nach ihrer Vereinigung mit dem Hüblschen Gemenge 15,2 ccm von $^1/_{10}$-Natriumthiosulfat.

In einem blinden Versuch (ohne Fett) wurden 44,7 ccm verbraucht.

Also: 44,7 — 15,2 = 29,5.

Diese 29,5 ccm entsprechen:

$$29{,}5 \times 0{,}012351 = 0{,}36437\ \text{g Jod.}$$

Mithin wurden 0,36437 g Jod von 0,4433 g Fettsäuren fixiert.

In Prozent ergibt dies:

$$0{,}36437 : 0{,}4433 = x : 100$$

$$x = 82{,}19\,\%.$$

V. Schmelzpunkt der Fettsäuren: 30° bis 36,5°, Mittel: 33,25°.

2. Versuch.

Gewicht der Hündin 8,190 kg; Mittelpunkt einer jeden Frucht 65 g (Zahl der gewogenen Früchte usw.)

I. 14,100 g trockenes Pulver ergaben als Fettsäuren 0,7466 g.

In Prozent des Pulvers ergibt dies:

$$x = 5{,}29\,\%.$$

II. 14,100 g trockenes Pulver ergaben 0,2081 g unverseifbaren Substanzen.

In Prozent des Pulvers ergibt dies:

$$14{,}100 : 0{,}2081 = 100 : x$$

$$x = 1{,}47\,\%.$$

III. Berechnen wir den Gehalt an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen dieses Gemenges in Prozent, so erhalten wir: (0,7466 + 0,2081 = 0,9547)

$$0{,}9547 : 0{,}7466 = 100 : x$$

$$x = 78{,}20\,\%\ \text{Fettsäuren.}$$

Durch Subtraktion: 100 — 78,20 = 21,8 % unverseifbare Substanzen.

Man kann also sagen, daß ca. $^1/_5$ des Gemenges aus unverseifbaren Substanzen besteht.

IV. 0,1653 g Fettsäuren verbrauchten, nachdem sie mit dem Hübl-schen Gemenge vereinigt waren, 30 ccm Natriumthiosulfat.

In dem blinden Versuch (ohne Fett) wurden 42,6 ccm Thiosulfat verbraucht.

Also: $42{,}6 - 30 = 12{,}6$ ccm.

Diese 12,6 ccm entsprechen:

$12{,}6 \times 0{,}012193$ (Titer der Thiosulfatlösung) $= 0{,}15368$ g Jod.

Mithin wurden 0,15368 g durch 0,1653 g Fettsäuren fixiert.

In Prozent erhält man:

$$0{,}15368 : 0{,}1653 = x : 100$$
$$x = 92\,97\,\%.$$

V. Schmelzpunkt der Fettsäuren: (Mittel) 32,5°.

3. Versuch.

Gewicht der Hündin 4,310 kg; Mittelgewicht einer jeden Frucht 80 g (Zahl der gewogenen Früchte 3).

I. 14,500 g trockenes Pulver ergaben 0,6249 g Fettsäuren.

In Prozent des Pulvers ergibt dies:

$$14{,}5 : 0{,}6249 = 100 : x$$
$$x = 4{,}31\,\%.$$

II. 14,5 g trockenes Pulver ergaben 0,1859 g unverseifbare Substanzen.

In Prozent des Pulvers also:

$$14{,}5 : 0{,}1859 = 100 : x$$
$$x = 1{,}28\,\%.$$

III. Berechnen wir den Gehalt an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in Prozent des erwähnten Gemenges, so erhalten wir: $(0{,}6249 + 0{,}1859 = 0{,}8108)$

$$0{,}8108 : 0{,}6249 = 100 : x$$
$$x = 77{,}07\,\%$$ Fettsäuren.

Durch Subtraktion: $100 - 77{,}07 = 22{,}93\,\%$ unverseifbare Substanzen.

IV. 0,4028 g Fettsäuren verbrauchten, nachdem sie mit dem Hübl-schen Gemenge vereinigt waren, 13,10 ccm von $^1/_{10}$-Natriumthiosulfat.

In dem blinden Versuch (ohne Fett) wurden 45,3 ccm verbraucht.

Also: $45{,}3 - 13{,}10 = 30{,}20$.

Diese 30,20 ccm entsprechen:

$$30{,}2 \times 0{,}012197 = 0{,}36834 \text{ g Jod.}$$

Mithin wurden 0,36834 g durch 0,4028 g Fettsäuren gebunden.

Dies ergibt in Prozent:

$$0{,}36834 : 0{,}4028 = x : 100$$
$$x = 91{,}44\,\%.$$

V. Schmelzpunkt der Fettsäuren: 31,5° (Mittel von zwischen 27° und 34° schwankenden Werten).

4. Versuch.

Gewicht der Hündin 4,270 g; Mittelgewicht einer jeden Frucht 107,5 g (Zahl der gewogenen Früchte 4).

I. 18,13 g trockenes Pulver ergaben 1,2404 g Fettsäuren.

In Prozent des Pulvers ergibt dies:

$$18{,}13 : 1{,}2404 = 100 : x$$
$$x = 6{,}83\,\%.$$

II. 18,13 g trockenes Pulver ergaben 0,3570 g unverseifbare Substanzen, also in Prozent von trockenem Pulver:

$$18{,}13 : 0{,}3570 = 100 : x$$
$$x = 1{,}96\,\%.$$

III. Berechnen wir den Gehalt an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in Prozenten des erwähnten Gemenges, so erhalten wir: (0,3570 + 1,2404 = 1,5974)

$$1{,}5974 : 1{,}2404 = 100 : x$$
$$x = 77{,}65\,\%\ \text{Fettsäuren.}$$

Durch Subtraktion: $100 - 77{,}65 = 22{,}35\,\%$ unverseifbare Substanzen.

IV. Schmelzpunkt der Fettsäuren 31° bis 33°, Mittel 32°.

5. Versuch.

Gewicht der Hündin 4,850 kg; Mittelgewicht einer jeden Frucht 140 g (Zahl der gewogenen Früchte 3).

I. 14,35 g trockenes Pulver ergaben 0,9737 g Fettsäuren.

In Prozent des trockenen Pulvers ergibt dies:

$$14{,}35 : 0{,}9737 = 100 : x$$
$$x = 6{,}78\,\%.$$

II. 14,35 g trockenes Pulver ergaben als unverseifbare Substanzen 0,2806 g.

In Prozent des trockenen Pulvers ergibt dies:

$$14{,}35 : 0{,}2836 = 100 : x$$
$$x = 1{,}97\,\%.$$

III. Berechnen wir den Gehalt an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in Prozent des erwähnten Gemenges, so erhalten wir: (0,9737 + 0,2836 = 1,2573)

$$1{,}2573 : 0{,}9737 = 100 : x$$
$$x = 77{,}46\,\%\ \text{Fettsäuren.}$$

Durch Subtraktion: $100 - 77{,}46 = 22{,}54\,\%$ unverseifbare Substanzen.

IV. 0,3192 g Fettsäuren verbrauchten nach ihrer Vereinigung mit dem Hüblschen Gemenge

21,3 ccm $^1/_{10}$-Natriumthiosulfat.

In dem blinden Versuch (ohne Fett) wurden 44,2 ccm verbraucht. Mithin: $44{,}2 - 21{,}3 = 22{,}9$.

Diese 22,9 ccm entsprechen:

$$22{,}9 \times 0{,}012197 = 0{,}2793\ \text{g Jod.}$$

Also wurden 0,2793 g Jod durch 0,3192 g Fettsäuren gebunden.

In Prozent berechnet:

$$0{,}2793 : 0{,}3192 = x : 100$$
$$x = 87{,}50\,\%.$$

V. Schmelzpunkt der Fettsäuren: 30° bis 35°, Mittel 32,5°.

6. Versuch.

Gewicht der Hündin 3,930 kg; Mittelgewicht eines jeden Neugeborenen (am 1. Lebenstage) 178 g (Zahl der gewogenen Neugeborenen 5).

I. 14,582 g trockenes Pulver ergaben 1,045 g Fettsäuren.

In Prozent des trockenen Pulvers ergibt dies:

$$14{,}582 : 1{,}045 = 100 : x$$

$$x = 7{,}16\,\%.$$

II. 14,582 g trockenes Pulver ergaben 0,1651 g unverseifbare Substanzen.

In Prozent des trockenen Pulvers ergibt dies:

$$14{,}582 : 0{,}1651 = 100 : x$$

$$x = 1{,}13\,\%.$$

III. Berechnen wir den Gehalt an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in Prozent des Gemenges, so erhalten wir: (0,1651 + 1,045 = 1,2101)

$$1{,}2101 : 1{,}045 = 100 : x$$

$$x = 86{,}36\,\%\ \text{Fettsäuren.}$$

Durch Subtraktion: $100 - 86{,}36 = 13{,}64\,\%$ unverseifbare Substanzen.

IV. 0,2619 g Fettsäuren verbrauchten nach ihrer Vereinigung mit dem Hüblschen Gemisch 24,15 ccm von $^1/_{10}$-Natriumthiosulfat.

In dem blinden Versuch (ohne Fett) wurden 42,6 ccm verbraucht.

Also: $42{,}6 - 24{,}15 = 18{,}45$.

Diese 18,45 g entsprechen:

$$18{,}45 \times 0{,}012197 = 0{,}225034\ \text{g Jod.}$$

Mithin wurden 0,22503 g Jod von 0,2619 g Fettsäuren gebunden.

In Prozent ergibt dies:

$$0{,}2619 : 0{,}2250 = 100 : x$$

$$x = 85{,}9\,\%.$$

V. Schmelzpunkt der Fettsäuren: 35°.

7. Versuch.

Gewicht der Hündin 3,930 kg, eines 12tägigen jungen Hundes 270 g.

I. 12,974 g trockenes Pulver ergaben 2,5744 g Fettsäuren.

In Prozent des trockenen Pulvers ergibt dies:

$$12{,}974 : 2{,}5744 = 100 : x$$

$$x = 19{,}83\,\%.$$

II. 12,974 g trockenes Pulver ergaben 0.2734 g unverseifbare Substanzen.

Dies ergibt in Prozent des trockenen Pulvers:

$$12{,}974 : 0{,}2734 = 100 : x$$

$$x = 2{,}10\,\%.$$

III. Berechnen wir den Gehalt an Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in Prozent des Gemenges, so erhalten wir: (2,5744 + 0,2734 = 2,8478)

$$2{,}8478 : 2{,}5744 = 100 : x$$

$$x = 90{,}40\,\%\ \text{Fettsäuren.}$$

Durch Subtraktion: $100 - 90{,}4 = 9{,}60\,\%$ unverseifbare Substanzen.

IV. 0,3248 g Fettsäuren verbrauchten nach ihrer Vereinigung mit dem Hüblschen Gemenge 21,4 ccm von $^1/_{10}$-Natriumthiosulfat.

In dem blinden Versuch (ohne Fett) wurden 42,6 ccm verbraucht.

Mithin: $42{,}6 - 21{,}4 = 21{,}2$.

Diese 21,2 entsprechen:

$$21{,}2 \times 0{,}012197 = 0{,}25857 \text{ g Jod.}$$

Also wurden 0,25857 g Jod durch 0,3248 g Fettsäuren gebunden.

In Prozenten ergibt dies:

$$0{,}3248 : 0{,}258576 = 100 : x$$

$$x = 79{,}6\,\%.$$

Um die Unterschiede besser hervortreten zu lassen, stelle ich die erhaltenen Daten in einer Tabelle zusammen.

Tabelle.

Fortlaufende Nummer	Gewicht der Hündin (ohne Föten) g	Zahl der Föten	Mittleres Gewicht eines jeden Fötus g	Alter Tage	Höhere Fettsäuren in % des Trockenrückstandes	Unverseifbare Substanzen in % des Trockenrückstandes	Summe: Höhere Fettsäuren + unverseifbare Substanzen in % Trockenrückstandes	Höhere Fettsäuren in % der Summe: Fettsäuren + unverseifbare Substanzen	Unverseifbare Substanzen in % der Summe: Fettsäuren + unverseifbare Substanzen	Jodzahl des Gemenges der höheren Fettsäuren	Schmelzpunkt P. F. des Gemenges der Fettsäuren	Bemerkungen
1	7872	7	23	?	6,82	1,53	8,35	81,60	18,40	82,19	32,2°	vor der Entwicklung
2	8190	4	65	?	5,29	1,47	6,76	78,20	21,80	92,97	32,5°	
3	4310	3	80	?	4,31	1,28	5,59	77,07	22,93	91,44	31,5°	
4	4270	4	107	?	6,83	1,96	8,79	77,65	22,35	—	32°	
5	4850	3	140	?	6,78	1,97	8,75	77,46	22,54	87,50	33°	
		Zahl der Neugeborenen	Durchschnittsgewicht jedes Neugeborenen in g									
6	3930	5	178	1	7,16	1,13	8,29	86,36	13,64	85,9	35°	von derselben Mutter
7	3930	5	270	12	19,83	2,10	21,93	90,40	9,60	79,6	—	von derselben Mutter

Schlußfolgerungen.

1. Von 5 Versuchen, die an Hundeföten in verschiedenen Perioden der Entwicklung angestellt wurden, zeigen 4 eine enge Beziehung zwischen Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen. Einer Zunahme an höheren Fettsäuren entspricht auch eine solche Zunahme an unverseifbaren Substanzen; infolgedessen bleibt das Verhältnis der beiden Gruppen von Substanzen annähernd konstant. Nur bei einem der 5 Versuche zeigt sich eine mäßige Abweichung; in diesem Falle befanden sich die Embryonen in einem wenig vorgerückten Stadium der Entwicklung.

2. Die Jodzahl des Gemenges der höheren Fettsäuren ist während des fötalen Zustandes so hoch, daß man annehmen muß, daß außer der Ölsäure andere Säuren der nicht gesättigten Reihe vorhanden sind.

3. Von derselben Mutter geworfene Neugeborene zeigen im Zeitraum von 12 Tagen beträchtliche Zunahmen des Gehaltes an höheren Fettsäuren, während die Zunahme der unverseifbaren Substanzen dem nicht entspricht und deshalb das Verhältnis zwischen höheren Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen geändert wird.

4. Die Jodzahl nimmt bei den Neugeborenen ab und hat die Tendenz, sich der der höheren Fettsäuren des aufgespeicherten Fettes zu nähern.

Über die unverseifbaren Substanzen und die Fettsäuren in Organen und Geweben in den verschiedenen Entwicklungsperioden des Organismus in qualitativer und quantitativer Beziehung gedenke ich noch weitere Mitteilungen zu veröffentlichen.

Über Esterspaltung in den Geweben.

Von

P. Rona.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 24. April 1911.)

Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden,[1]) daß das Verfolgen der Änderung, die die Oberflächenspannung einer gesättigten wässerigen Esterlösung infolge fermentativer Spaltung erleidet, ein bequemes Verfahren darstellt, um die Gegenwart des entsprechenden Fermentes in einer physiologischen Flüssigkeit nachzuweisen. Auf diesem Wege konnte ein Mono- und Tributyrin spaltendes Ferment im Blut, resp. Serum der untersuchten Tierarten festgestellt werden; die Hydrolyse war jedoch nur im Kaninchen- und Meerschweinchenblut, resp. Serum stark ausgeprägt, bei den anderen Tierarten war sie nur äußerst schwach. Das Verfahren läßt sich, wie sich aus der vorliegenden Mitteilung ergibt, sehr gut auch bei der Untersuchung wässeriger Organextrakte anwenden. Die Verarbeitung der (von eben getöteten Tieren gewonnenen oder möglichst frisch vom Schlachthof bezogenen) Organe erfolgte so, daß das Organ zuerst gründlich vom Blut befreit, dann grob in einer Hackmaschine zerkleinert, schließlich durch ein engmaschiges Sieb getrieben wurde. Der Organbrei wurde nun abgewogen, (er betrug ge-

[1]) Vgl. Peter Rona und Leonor Michaelis, diese Zeitschr. 31, 345, 1911.

wöhnlich 20 bis 25 g), wurde mit der 5fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung versetzt und in einer mit Glasperlen versehenen Flasche $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunde in einem Schüttelapparat geschüttelt. Das Gemisch wurde nun in einer elektrisch betriebenen Zentrifuge etwa 20 Minuten zentrifugiert und die abgehobene Flüssigkeit zur Untersuchung benutzt. Da das Blut der untersuchten Tierarten (Rind, Schwein, Hammel, Hund) nur äußerst wenig wirksam ist, konnte eine spurweise Beimischung von Blut in dem Gewebeextrakt, wie dies in einigen Versuchen der Fall war, die beobachtete Spaltung des Esters nicht beeinflussen. In einigen Fällen wurde der Organbrei in dünnster Schicht auf Glasplatten gestrichen und bei Zimmertemperatur durch Überleiten von einem mittels eines elektrischen Ventilators getriebenen Luftstrom getrocknet. Das Organpulver wurde dann mit Glaspulver gründlich verrieben und dann, wie vorher das frische Material, im Schüttelapparat mit physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt. Zu den Versuchen wurde (wenn nicht anders angegeben) je 1 ccm der Organextrakte verwendet, das zu je 30 ccm der gesättigten wässerigen Mono- bzw. Tributyrinlösung hinzugefügt wurde. Von letzteren wurden stets frisch bereitete Lösungen angewandt. Das mit überschüssigem Ester versetzte Wasser wurde längere Zeit (ca. $^1/_2$ Stunde) geschüttelt, die Emulsion durch ein mit Wasser befeuchtetes Filter filtriert und das klare Filtrat in einen zirka 70 ccm fassenden Tropftrichter gefüllt. Eventuell durch das Filter gegangene kleine Estertropfen sammeln sich an der Oberfläche der Flüssigkeit an; bei der Entnahme der Flüssigkeit durch das lange Trichterrohr kann eine von ungelösten Esterteilchen freie Lösung erhalten werden. In jeder Probe wurde außerdem 1 ccm eines Phosphatgemisches ungefähr von der Reaktion des Blutes ($1\,^n/_3$ primäres Phosphat, $7\,^n/_3$ sekundäres Phosphat, mit $[H] = 0{,}35.10^{-7}$) hinzugefügt, wodurch die Reaktion festgelegt und das Auftreten freier Säure verhindert wurde.[1]) Stets wurden Kontrollproben angesetzt, bei denen man ebenfalls 30 ccm gesättigte wässerige Esterlösung mit 1 ccm Phosphatgemisch (1 : 7) und 1 ccm der zu untersuchenden Organ-

[1]) Nach vollendeter Spaltung wurde die H-Ionenkonzentration im Reaktionsgemisch mittels Konzentrationsketten zu $0{,}39 \cdot 10^{-7}$ bis $0{,}47 \cdot 10^{-7}$ gefunden.

extrakte versetzte, nur wurde in einer Reihe der Kontrollproben vorher aufgekochter Organextrakt verwendet, in einer anderen einige Centigramm FNa zu dem Gemisch hinzugefügt. In einer Anzahl Versuchen wurde nicht das Phosphatgemisch 1:7, sondern 1:2 dem Reaktionsgemisch hinzugefügt, also ein Gemisch von neutraler Reaktion ($[H] = 1.10^{-7}$), da geprüft werden sollte, ob die Reaktion in diesem engen Bereich bereits irgendwelchen Einfluß auf die Esterspaltung ausübt. Die vorliegenden Versuche sollten zunächst nur über die Anwesenheit des esterspaltenden Fermentes und über die ungefähre Menge desselben in den verschiedenen Organextrakten orientieren. Um jede Bakterienwirkung auszuschließen, sind die Beobachtungen nur auf die ersten Stunden (2 bis $2^1/_2$ Stunden) ausgedehnt, bzw. nur innerhalb dieses Zeitraumes gewonnene Werte für die Beurteilung der Verhältnisse benutzt worden. Über den genaueren zeitlichen Verlauf des Fermentprozesses und den weiteren Verlauf der Hydrolyse in quantitativer Hinsicht sind Untersuchungen bereits im Gange. In den folgenden Tabellen ist nur die Tropfenzahl der betreffenden Gemische am Anfang und dann nach 1 bis 2 Stunden angegeben. Die Ausschläge sind so deutlich und kehren bei Wiederholung der Versuche so konstant wieder, daß sie uns ein gutes Bild von dem Verhalten der verschiedenen (wässerigen) Organextrakte geben. Alle Versuche sind im Wasserbad bei 19° angestellt. Die Versuche mit dem Phosphatgemisch 1:7 sind mit I, mit dem Phosphatgemisch 1:2 mit II bezeichnet.

I. Versuche mit Monobutyrin.

1. Niere.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort	nach $^1/_2$ St.	nach 1 St.	nach $2^1/_2$ St.	Probe m. aufgekocht. Extrakt nach $2^1/_2$ St.	Probe mit FNa-Zusatz nach $2^1/_2$ St.
Hammel . . .	169	138	127	120	170	171
Rind	169	—	—	116	170	170
„ (getrockn.)	169	—	—	138	169	172
„	I 169	—	—	I 110	169	170
	II 169	—	—	II 113		
„	I 169	—	I 139	—	169	169
	II 169	—	II 140	—		
Pferd	165	—	—	135	—	—

2. Muskel.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Rind	160	160	157	157	160	160
„	169	169	169	169	169	170
„ (getrockn.)	154	154	154	154	—	—
Kalb	167	167	167	168	167	168
„ (getrockn.)	167	168	167	167	—	—
„	170	169	170	171	—	—
„ (getrockn.)	172	172	170	170	—	—
Schwein . . .	169	169	168	167	170	170
„ (getrockn.)	168	169	168	169	—	—
Mensch	168	—	168	—	—	170

3. Leber.

Tierart	Tropfenzahl			
	sofort	nach 2 St.	Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
Rind (getrockn.)	171	156	171	172
Schwein . . .	170	136	170	171

4. Milz.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Schwein . . .	168	167	152	153	167	165
„ (getrockn.)	169	—	165	—	—	170
Pferd	168	167	155	154	—	—

5. Lunge.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Hammel . . .	160	160	124	128	160	160
„ (getrockn.)	167	165	142	141	—	—
Schwein . . .	170	171	165	164	171	172
„ (getrockn.)	169	169	166	166	—	—

6. Herzmuskel.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Schwein . . .	169	167	166	166	—	169
„ (getrockn.)	170	170	167	164	—	—

7. Gehirn.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Schwein . . .	167	168	165	167	—	—
„ . . .	170	171	169	168	170	172

II. Versuche mit Tributyrin.

1. Niere.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Hammel . . .	146	148	103	100	149	150
„ (getrockn.)	145	145	101	102	—	—
Rind	148	—	100	—	150	151
Hammel . . .	156	154	116	114	—	157
Hund	156	154	120	116	158	158
Katze	146	145	107	108	—	—

2. Muskel (gestreifter und Herzmuskel).

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Rind	156	155	153	155	—	156
„ (getrockn.)	155	154	154	153	—	—
Kalb	151	150	148	149	151	152
Schwein (Herz)	156	157	156	158	—	158
Hund (Herz) .	157	155	155	156	—	—

3. Leber.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Hammel . . .	151	—	106	—	152	152
„ (getrockn.)	154	153	112	110	—	—
Hund	155	154	114	110	155	—
Katze	150	150	109	108	—	—

4. Milz.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Schwein . . .	155	—	145	—	156	154
„ (getrockn.)	156	156	154	154	—	—
Katze	155	154	135	135	—	—
Pferd	155	155	135	133	156	155

5. Gehirn.

Tierart	Tropfenzahl			
	sofort	nach 3 St.	Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 3 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 3 St.
Schwein . . .	154	152	154	154
Pferd	155	154	155	155
Rind	155	155	155	155
Kalb	155	153	155	155

6. Lunge.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Schwein . . .	152	152	127	129	150	150
„ (getrockn.)	153	152	148	146	—	—
Pferd	154	154	153	152	—	154
Rind	154	154	148	147	154	154
Hammel . . .	154	154	117	128	154	154

7. Pankreas.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort	nach 5 Min.	nach 15 Min.	nach $^1/_2$ St.	Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 1 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 1 St.
Meerschweinch.	I 143 II 145	I 133 —	I 112 II 112	I 106 II 105	150	150
Rind	—	—	I[1])111 II[2])112	—	—	—

[1]) 1 ccm Organextrakt.

[2]) 0,1 ccm Organextrakt.

8. Darmschleimhaut.

Tierart	Tropfenzahl					
	sofort		nach 2 St.		Probe m. aufgekocht. Extrakt nach 2 St.	Probe mit FNa-Zusatz nach 2 St.
	I	II	I	II		
Schwein . . .	150	150	115	120	150	—
„ . . .	151	151	134	138	152	—
„ . . .	154	154	140	140	—	154

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, kann bei den meisten der untersuchten wässerigen Organextrakte eine Spaltung von Mono- und Tributyrin konstatiert werden. Ungemein energisch ist diese Spaltung beim Pankreasextrakt, wo schon in wenigen Minuten ein totaler Abbau des Tributyrins stattfand. Sehr ausgeprägt ist die Hydrolyse auch bei den Nieren der verschiedenen Tierarten; dann folgen Leber, Darmschleimhaut. Etwas schwächer scheint die Wirkung in der Milz und in der Lunge zu sein. Keine Spaltung war innerhalb der in Betracht kommenden Zeit im Muskelextrakt nachzuweisen; auch Gehirnextrakt erwies sich unwirksam. Wesentliche Unterschiede im Verhalten der Organextrakte verschiedener Tiere ergaben sich nicht. Nur die Lungen von Pferd und Rind erwiesen sich im Gegensatz zu Schwein und Hammel gegen Tributyrin kaum wirksam. Auch im Verhalten gegen das Monobutyrin einerseits und das Tributyrin andererseits waren keine prinzipiellen Unterschiede nachweisbar, wie dies bereits auch beim Blut gefunden wurde. Die Spaltung erfolgte vollkommen in gleicher Weise, ob ein Phosphatgemisch 1:7 oder ein solches 1:2 zu dem Gemisch hinzugefügt wurde; innerhalb dieses engen Bereiches der H-Ionen-Konzentration ist also die Reaktion ohne Einfluß auf die fermentative Spaltung. Arbeitete man mit aufgekochten oder mit FNa versetzten Organextrakten, so war innerhalb der Beobachtungszeit in keinem Falle eine Wirkung nachweisbar. — Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Beiträge zur Frage der Glykolyse. II[1])

Von

P. Rona und A. Döblin.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 24. April 1911.)

Trotz eifriger Erforschung der Erscheinungen, die mit dem Verschwinden des Traubenzuckers im Blute oder in Organsäften zusammenhängen, kann kaum ein Befund der experimentellen Forschung auf diesem Gebiete zu dem gesicherten Besitz der physiologischen Chemie gerechnet werden. Versuch steht überall gegen Versuch, und nicht einmal über die Grundtatsachen herrscht Einigkeit. Über die glykolytische Wirksamkeit der aus den Organen gewonnenen Extrakte findet man die widersprechendsten Ansichten, und erst vor kurzem betont wieder De Meyer[2]), daß diese möglicherweise nur eine Funktion der Blutmenge ist, die die Organsäfte im gegebenen Falle enthalten. Ein genaues Studium der Glykolyse im Blute, als Grundlage für weitere Untersuchungen, erschien uns trotz der vorliegenden wertvollen Arbeiten in dieser Richtung deshalb keineswegs überflüssig.[3]) Die Verhältnisse für eine experimentelle Bearbeitung des Problems liegen hier schon deshalb günstiger, weil die aseptische Durchführung der Versuche ohne Schwierigkeit realisierbar ist. Wir wollen gleich hier bemerken, daß unsere sämtlichen Versuche unter aseptischen Kautelen durchgeführt

---

[1]) 1. Mitteilung. L. Michaelis und P. Rona. Diese Zeitschr. 23, 364, 1910.

[2]) J. De Meyer, Centralbl. f. Physiol. 23, 965, 1910.

[3]) Mit dem Ausdruck „Glykolyse" soll in dieser Arbeit nur ganz allgemein das Verschwinden des Traubenzuckers aus dem Blut bezeichnet werden. Über die Einzelheiten der chemischen Vorgänge bei dem Zuckerverlust finden sich in dieser Mitteilung keine Angaben.

wurden und das Gelingen der Asepsis durch Impfversuche stets kontrolliert wurde. Nur die Versuche, in denen irgendwelche Bakterienwirkung ausgeschlossen war, wurden verwertet. Sämtliche Versuche sind an aus der Vene von Menschen steril entnommenem Blut ausgeführt. Das Blut wurde in sterilen, mit Glasperlen versehenen Flaschen aufgenommen, durch Schütteln defibriniert, durch sterile Gaze filtriert und die erforderliche Menge (gewöhnlich 20 ccm) durch sterile Pipetten entnommen.

Um die Ausschläge des Zuckerverlustes deutlicher zu machen, wurde den einzelnen Blutproben meist noch eine genau bekannte Menge einer sterilen Traubenzuckerlösung zugefügt. Die Enteiweißung geschah in allen Fällen nach der Eisenmethode von Michaelis und Rona, die Zuckerbestimmung polarimetrisch in einem Polarisationsapparat von Schmidt und Haensch mit dreiteiligem Gesichtsfeld. Der Fehler der Ablesung beträgt $\pm 0{,}01^{\circ}$. Es wurden bei jeder Bestimmung 8 bis 10 Ablesungen gemacht.

Zunächst interessierte uns die Frage, wie weit Eingriffe, die experimentell wohl am häufigsten vorkommen dürften: Hämolyse und Verdünnung, die Glykolyse des Blutes beeinflussen.

Was die Hämolyse anbelangt, so zeigen unsere Versuche eindeutig, daß schonende Auflösung der Blutkörperchen mit Wasser die Glykolyse aufhebt.[1]) Gleichzeitig ergibt sich, daß bloße Verdünnung des Blutes mit Ringerlösung die Glykolyse nicht beeinflußt.

Nr. 1. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 5 St.	Verlust
a) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser .	89,10	88,37	0,73
b) 20 ccm Blut + 80 ccm dest. Wasser; nach erfolgter Hämolyse + 100 ccm 1,8%ige NaCl-Lösung	89,10	88,94	0,16
c) 20 ccm Blut + 80 ccm dest. Wasser; nach erfolgter Hämolyse + 100 ccm Ringer (doppelt konzentriert) . . .	89,10	86,79	2,31
d) 20 ccm Blut + 180 ccm Ringer . . .	89,10	53,83	35,27

[1]) Spärliche Versuche in dieser Richtung liegen von M. Arthus, Arch. de Physiol. [5], 23, 425, 1891; 24, 339, 1892 und von Doyon und A. Morel, Compt. rend. Soc. Biol. 55, 215, 1903, vor.

Nr. 2. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
a) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser .	83,67	84,00	—
b) 20 ccm Blut + 80 ccm dest. Wasser; nach erfolgter Hämolyse + 100 ccm 1,8%ige NaCl-Lösung	83,67	81,80	1,87
c) 20 ccm Blut + 80 ccm dest. Wasser; nach erfolgter Hämolyse + 100 ccm Ringer (doppelt konz.)	83,67	81,70	1,97
d) 20 ccm Blut + 180 ccm Ringer . . .	83,67	63,57	20,10

Nr. 3. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 5 St.	Verlust
a) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser .	107,66	102,14	5,52
b) 20 ccm Blut + 80 ccm dest. Wasser. + 100 ccm 1,8%ige NaCl-Lösung .	107,66	104,32	3,34
c) 20 ccm Blut + 80 ccm dest. Wasser + 100 ccm Ringer (doppelt konz.) .	107,66	101,80	5,86
d) 20 ccm Blut + 180 ccm Ringer . . .	107,66	70,82	36,84

Nr. 4. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
a) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser .	98,14	96,15	1,99
b) 20 ccm Blut + 80 ccm dest. Wasser + 100 ccm Ringer (doppelt konz.) .	98,14	97,34	0,80
c) 20 ccm Blut + 180 ccm Ringer im Brutschrank stehend	98,14	69,53	28,61
d) 20 ccm Blut + 180 ccm Ringer im Brutschrank geschaukelt	98,14	56,13	42,01

Nr. 5. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
a) 20 ccm Blut im Brutschrank stehend	91,30	76,39	14,91
b) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser .	91,30	91,72	—
c) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser + 2 ccm Phosphatgemisch (1 pr. 6 sek. $^1/_3$ n.)	91,30	89,35	1,95

Nr. 6. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
20 ccm Blut	98,50	68,32	30,18
20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser . .	98,50	97,73	0,77

Nr. 7. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
a) 20 ccm Blut im Brutschrank stehend .	75,80	58,64	16,16
b) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser .	75,80	75,70	0,10
c) 20 ccm Blut + 180 ccm dest. Wasser + 2 ccm Phosphatgemisch (1:6) . .	75,80	74,31	0,49

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß eine schonende Hämolyse mittels Wasser die Glykolyse aufhebt. Die geringen Verluste, die in einigen Versuchen nachweisbar sind, übersteigen die Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode nur in 2 Fällen [Versuch 3a) und c)] gerade. Da die vollständige Hämolyse immerhin einige Minuten erfordert, so könnte eventuell diese minimale Abnahme des ursprünglichen Zuckergehaltes auch auf die während dieser Zeit stattgehabte Glykolyse bezogen werden. Hingegen war die Verdünnung als solche mit Ringer oder mit physiologischer Kochsalzlösung ohne jeden Einfluß auf die Glykolyse. Daß dem lackfarbenen Blut die glykolytische Fähigkeit abgeht, spricht sehr zugunsten der Anschauung, die auch von Doyon und Morel vertreten wird, daß zur Glykolyse die intakten Formelemente des Blutes erforderlich sind. Hiermit steht auch die Tatsache im Einklang, daß im Serum kein oder nur äußerst geringer Zuckerschwund zu beobachten ist.[1]) Nach unseren Versuchen konnte diese Angabe in den meisten Fällen bestätigt werden, in einigen war allerdings eine die Fehlerquellen der Methodik etwas übersteigende Zuckerabnahme vorhanden. Immerhin war der Zuckerverlust auch in diesen Fällen im Vergleich zu der Glykolyse im Gesamtblut nur gering.

Nr. 8. Dauer des Versuchs 7 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg	
	sofort	nach 7 St.
20 ccm Serum (obere Schicht) + 180 ccm dest. Wasser	112,53	111,05
20 ccm Serum (untere Schicht) + 180 ccm Ringer	112,53	108,75
20 ccm Serum (obere Schicht + 180 ccm Ringer	112,53	109,82

[1]) Vgl. namentlich Lépine und Boulud. Compt. rend. Soc. Biol. 40, 901, 1906.

Nr. 9. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg	
	sofort	nach 5 St.
20 ccm Serum (obere Schicht)	122,07	120,62
20 ccm Serum (untere Schicht)	122,07	115,42

Nr. 10. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg	
	sofort	nach 6 St.
20 ccm Serum (obere Schicht)	105,60	101,54
20 ccm Serum (untere Schicht)	105,60	106,06

Nr. 11. Dauer des Versuchs 8 Stunden. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg	
	sofort	nach 8 St.
20 ccm Serum	116,51	99,76
20 ccm Serum	111,33	103,38

Die vom Gesamtblute zerstörten Zuckermengen sind nach reichhaltiger Erfahrung innerhalb der in Betracht kommenden Zeit stets bedeutend größer gewesen als in den angeführten Serumversuchen, in denen nur im Versuch 11 ein namhafterer Verlust an Zucker konstatiert werden konnte.

Die Glykolyse im Gesamtblut ist bekanntlich gerade zu Beginn nach der Blutentnahme am energischsten und kann unter Umständen bereits in den ersten 3 bis 4 Stunden die ganze Menge des Zuckers betreffen.

Doch verhalten sich, wie wir im Laufe unserer Untersuchungen beobachten konnten, die verschiedenen Blutproben, was die glykolytische „Kraft" betrifft, sehr verschieden, so daß man einen für alle Blutproben gültigen Grad der Zuckerzerstörung nicht gut angeben kann. Neben individuellen Verschiedenheiten in den einzelnen Blutproben ist auch zu beachten, daß die vorhandenen absoluten Zuckermengen einen Einfluß auf die Zuckerzerstörung insofern ausüben, als von größeren Zuckermengen unter gleichen Versuchsbedingungen prozentualiter relativ geringere Zuckermengen der Glykolyse anheimfallen.

So wurden in den folgenden Versuchen von 20 ccm Blut im Brutschrank die angegebenen Mengen Zucker zerstört.

Nr. 12. Dauer des Versuchs 15 Stunden. Temperatur 37°.

Zuckermenge in mg			
sofort	nach 15 St.	Verlust	Verlust in %
29,46	0,0	29,46	100
52,73	0,0	52,73	100
76,16	20,66	55,50	73
122,76	56,07	66,69	54

Nr. 13. Dauer des Versuchs 15 Stunden. Temperatur 37°.

Zuckermenge in mg			
sofort	nach 15 St.	Verlust	Verlust in %
26,50	11,81	14,69	55,5
53,00	38,38	14,62	27,5
106,00	91,45	14,55	14,5

Nr. 14. Dauer des Versuchs 15 Stunden. Temperatur 37°.

Zuckermenge in mg			
sofort	nach 15 St.	Verlust	Verlust in %
41,28	11,17	30,11	78
63,08	25,42	37,66	62
106,38	76,69	29,69	30
193,58	170,96	22,62	11

Nr. 15. Dauer des Versuchs 15 Stunden. Temperatur 37°.

Zuckermenge in mg			
sofort	nach 15 St.	Verlust	Verlust in %
69,89	37,46	32,43	47
116,49	75,31	41,18	35

Eine Beziehung zwischen Zucker und Blut-(Ferment-)menge ergeben auch Versuche mit gleichen Zucker- und wechselnden Blutmengen.

Nr. 16. Dauer des Versuchs 8 Stunden. Temperatur 37°.
Die einzelnen Proben befinden sich in einem Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg			Blutmenge (Diabetes)	Zuckerverlust
sofort	nach 8 St.	Verlust	ccm	%
64,40	63,30	1,10	10	1,7
64,40	50,57	13,83	15	20
64,40	42,75	21,65	20	33
64,40	30,66	33,74	25	52

Nr. 17. Dauer des Versuchs 8 Stunden. Temperatur 37°.
Die Proben befinden sich in einem Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg			Blutmenge	Zuckerverlust
sofort	nach 8 St.	Verlust	ccm	%
65,10	52,55	12,55	10	19
65,10	46,67	18,43	15	29
65,10	21,09	44,01	20	67
65,10	16,61	48,49	30	75

Nr. 18. Dauer des Versuchs 10 Stunden. Temperatur 37°.
Die Proben befinden sich in einem Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg			Blutmenge	Zuckerverlust
sofort	nach 10 St.	Verlust	ccm	%
61,60	57,63	3,97	5	6
61,60	44,34	17,26	10	28
61,60	14,74	46,86	15	76
61,60	11,04	50,56	20	83

Nr. 19. Dauer des Versuchs 15 Stunden. Temperatur 37°.
Die Proben befinden sich in einem Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg			Blutmenge	Zuckerverlust
sofort	nach 15 St.	Verlust	ccm	%
63,0	63,0	0,0	5	0
63,0	56,51	6,49	10	10
63,0	35,33	27,67	20	44

Aus all diesen Versuchen ergeben sich quantitative Beziehungen zwischen Zucker- und Blutmenge, was die Glykolyse betrifft. Eine eingehende Betrachtung der hier obwaltenden Verhältnisse, wie auch des zeitlichen Verlaufes der Glykolyse wird in einer späteren Mitteilung erfolgen.[1]) Hier sollte nur das im Verhältnis zum Serum bedeutende Ausmaß der Glykolyse unter ähnlichen Versuchsbedingungen gezeigt werden. Die letzten Versuchsreihen mahnen aber auch zur Vorsicht, unbedeutenden Blutresten eine größere Rolle bei der Glykolyse in Organversuchen beizumessen. Namentlich in Organversuchen, bei denen auch eine Hämolyse stattfindet, kann die Glykolyse nicht auf die Gegenwart von Blut zurückgeführt werden.

Sprachen die vorhergehenden Versuche sehr zugunsten der Tatsache, daß bei der Glykolyse den intakten Formelementen des Blutes eine wesentliche Bedeutung zukommt, so war es weiterhin von Wichtigkeit, die verschiedenen Faktoren kennen

[1]) Angaben über den zeitlichen Verlauf der Glykolyse finden sich bei Arthus (l. c.) und in verschiedenen Mitteilungen von Lépine.

zu lernen, die diese Glykolyse zu beeinflussen vermögen.[1]) Wir untersuchten zunächst den Einfluß einiger Gase, vor allem des Sauerstoffs, auf die Zuckerzerstörung. In Übereinstimmung mit Angaben anderer Autoren fanden wir, daß der Sauerstoff die Glykolyse bis zu einem gewissen Grade fördert. Dies beweisen schon Versuche, bei denen vergleichend die zerstörte Zuckermenge untersucht wurde, einmal an Blutproben, die im Brutschrank in mit Wattebausch versehenen Kölbchen standen, dann an Blutproben, die im Brutschrank in einem elektrisch betriebenen Schaukelapparat einer regelmäßigen, sachten Bewegung ausgesetzt waren.[2]) Die Durchlüftung der Proben war im zweiten Falle eine viel ausgiebigere. Dementsprechend war die Glykolyse auch bei diesen Proben bedeutender als bei den stehenden, wozu noch die bessere Durchmischung des Serums und der Blutkörperchen beigetragen haben mochte.

Nr. 20. Dauer des Versuchs 15 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) stehend, b) im Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 15 St.		Verlust in %	
	a	b	a	b
104,39	76,73	62,89	27	40
61,89	45,80	25,73	26	60
40,49	25,41	0,0	37	100

Nr. 21. Dauer des Versuchs 15 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) stehend, b) im Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 15 St.		Verlust in %	
	a	b	a	b
62,38	21,83	9,43	64	85

[1]) Es sei hier beiläufig kurz erwähnt, daß es uns bis jetzt in keinem Fall gelungen ist, an bei Zimmertemperatur getrocknetem Blut eine glykolytische Fähigkeit zu konstatieren. Nach diesen Erfahrungen, die noch weiter ausgedehnt werden müssen, würde einfaches Trocknen genügen, um die glykolytische Fähigkeit aufzuheben.

[2]) Bei diesen Versuchen lagen die Reagensgläser auf einer horizontalen Schaukelvorkehrung, die, in einem Brutschrank angebracht, elektrisch derart in Bewegung gesetzt werden konnte, daß sie jede Minute 20 bis 30 leichte Schaukelbewegungen ausführte, die in Perioden von 5 bis 6 mit gleichen Unterbrechungen erfolgten. Es blieb dabei das Blut hellrot, sedimentierte nicht. Der Apparat ist uns von Geh.-Rat Prof. A. Fraenkel zur Benutzung freundlichst überlassen worden.

Nr. 22. Dauer des Versuchs 10 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) stehend, b) im Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 10 St.		Verlust in %	
	a	b	a	b
93,0	36,16	19,53	61	79

Nr. 23. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) stehend, b) im Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 6 St.		Verlust in %	
	a	b	a	b
83,56	59,47	54,49	28	34

Nr. 24. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) stehend, b) im Schaukelapparat.

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 6 St.		Verlust in %	
	a	b	a	b
98,136	69,53	56,13	29	42

Leitete man durch die Blutproben einmal Luft, einmal reinen Sauerstoff durch, so war kein nennenswerter Unterschied in der Stärke der Glykolyse zu konstatieren.

Nr. 25. Dauer des Versuchs 4 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) Luftdurchleitung, b) Sauerstoffdurchleitung.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 4 St.	
	a	b
84,19	71,65	73,23

Nr. 26. Dauer des Versuchs 4 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) Luftdurchleitung, b) Sauerstoffdurchleitung.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 4 St.	
	a	b
81,67	65,32	65,06

Nr. 27. Dauer des Versuchs 4 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) Luftdurchleitung, b) Sauerstoffdurchleitung.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 4 St.	
	a	b
89,14	72,77	77,29

Nr. 28. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) Luftdurchleitung, b) Sauerstoffdurchleitung.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 5 St.	
	a	b
67,62	52,77	53,28

Nr. 29. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) Luftdurchleitung, b) Sauerstoffdurchleitung.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 5 St.	
	a	b
75,00	46,52	55,38

Die vergleichenden Versuche mit stehenden und bewegten Blutproben sprachen für den Glykolyse fördernden Einfluß des Sauerstoffes. Für unsere Auffassung über das Wesen des glykolytischen Prozesses ist es nun von großer Bedeutung, daß Glykolyse auch bei vollkommener Abwesenheit des Sauerstoffs vor sich geht. Dies zeigen nicht nur die folgenden anaeroben Versuche 30 bis 34, sondern auch die Versuche 35 bis 45, bei denen während der Dauer des Versuches Wasserstoff durch das Blut geleitet wurde.

Versuche unter anaeroben Bedingungen[1]).
Dauer des Versuchs 16 Stunden. Temperatur 37°.

Nr.	Zuckermenge in mg			
	sofort	nach 16 St.	Verlust	Verlust in %
30	300,50	278,52	21,98	7
31	207,50	134,80	72,70	34
32	114,50	61,09	55,41	48
33	68,50	32,95	35,06	51

[1]) Die Blutproben kamen in hohen Reagensgläsern mit Watte verstopft in einen Exsiccator, dessen Boden mit frischer alkalischer Pyrogallus-lösung bedeckt war. Der Exsiccator wurde im Verlaufe des Versuchs 3 mal evakuiert.

Nr. 34. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) im Schaukelapparat, b) anaerob.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 6 St.	
	a	b
82,57	62,43	59,47

Versuche in Wasserstoffatmosphäre.

Nr. 35. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 5 St.	Verlust
Luft	67,62	52,77	14,33
Sauerstoff .	67,62	53,29	14,85
Wasserstoff .	67,62	37,08	30,54

Nr. 36. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 5 St.	Verlust
Luft	75,00	46,52	28,48
Sauerstoff .	75,00	55,38	19,62
Wasserstoff .	75,00	56,49	19,51

Nr. 37. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 5 St.	Verlust
Luft	93,59	77,28	16,30
Sauerstoff .	93,59	50,27	43,32
Wasserstoff .	93,59	65,60	27,99

Nr. 38. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 5 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	91,3	76,39	14,91
Blut, H-Durchleitung . . .	91,3	63,94	27,35

Nr. 39. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	116,33	86,32	30,01
Blut, H-Durchleitung . . .	116,33	52,36	63,97

Nr. 40. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	87,61	69,30	18,31
Blut, H-Durchleitung . . .	87,61	69,88	17,73

Nr. 41. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	82,25	50,71	31,53
Blut, H-Durchleitung . . .	82,25	48,03	34,22

Nr. 42. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	93,61	65,81	28,80
Blut, H-Durchleitung . . .	93,61	69,42	24,19

Nr. 43. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	84,61	43,67	40,94
Blut, H-Durchleitung . . .	84,65	52,80	31,81

Nr. 44. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 5 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	76,87	36,97	39,90
Blut, H-Durchleitung . . .	76,87	37,07	38,80
do. . . .	76,87	37,19	39,68

Nr. 45. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 6 St.	Verlust
Blut, im Brutschrank stehend	92,56	65,13	27,43
Blut, H-Durchleitung . . .	92,56	63,07	29,49

Aus der Gesamtheit der Versuche ergibt sich eine nennenswerte Zuckerzerstörung in einer reinen Wasserstoffatmosphäre.

Man könnte einwenden, die Zuckerzerstörung wäre auf die Sauerstoffmengen zurückzuführen, die aus dem Blut auch bei Wasserstoffdurchleitung nicht momentan, sondern erst nach einer gewissen Zeit entweichen. Bedenkt man jedoch, daß das Blut bereits nach etwa 10 Minuten Wasserstoffdurchleitung eine tief dunkle Farbe annimmt, von der Hauptmenge des Sauerstoffs zumindest also befreit ist, andererseits die zerstörten Zuckermengen ganz nennenswert und denen in Versuchen bei Luftzutritt im allgemeinen gleich sind, so wird man dem eventuell in den Blutproben noch vorhandenen Sauerstoff wohl schwerlich die Bedeutung zuschreiben können. Für das Wesen der Glykolyse mußte man also auf Grund dieser Versuche folgern, daß die Glykolyse, wenigstens in ihrem ersten Stadium, nicht ein Oxydationsprozeß ist, eine Ansicht zu der auf anderem Wege bereits früher mehrere Forscher, wie M. Jacoby, Blumenthal, Feinschmidt, N. Sieber, gekommen sind.[1])

Daß die Glykolyse in einer Wasserstoffatmosphäre gut vonstatten geht, hat N. Sieber[2]) in ihren Untersuchungen an wässerigen Fibrinextrakten ebenfalls finden können. In diesem Punkte herrscht demnach eine gute Übereinstimmung mit unseren Versuchen. Nicht bestätigen konnten wir hingegen die Angabe der Verfasserin über die günstige Wirkung der Kohlensäure auf die Glykolyse. In allen unseren Versuchen hemmte reine Kohlensäure die Glykolyse ganz bedeutend; wurde CO_2 der Luft in kleineren Mengen zugefügt, von etwa 10% an abwärts, so war kein Einfluß auf die Glykolyse, weder in hemmender noch in fördernder Richtung, zu beobachten.

Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) im Brutschrank stehend, b) mit CO_2-Durchleitung.

	Zuckermenge in mg				
	sofort	nach 6 St.		Verlust	
		a	b	a	b
Nr. 46	74,73	39,63	I. 72,28 II. 71,20	35,10	I. 1,45 II. 3,53
„ 47	104,65	72,25	I. 93,33 II. 94,00	32,40	I. 11,32 II. 10,25
„ 48	85,64	63,85	78,21	21,79	7,43
„ 49	84,61	43,67	71,84	40,94	12,77
„ 50	84,61	43,67	80,83	40,94	3,78
„ 51	93,61	65,81	I. 83,22 II. 84,60	28,80	I. 10,39 II. 9,00

[1]) Vgl. hierzu Oppenheimer, Fermente, 3. Aufl., S. 480, 1909.
[2]) N. Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 484. Vgl. auch 44, 560.

Nr. 52. Dauer des Versuchs 4 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) mit Luftdurchleitung, b) mit Luft-CO_2-Durchleitung.
Der Luft sind etwa 10% CO_2 beigemengt.

sofort	Zuckermenge in mg			
	nach 4 St.		Verlust	
	a	b	a	b
83,5	53,89	60,4	29,6	23,09

Nr. 53. Dauer des Versuchs 5 Stunden Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) Luftdurchleitung, b) Luft-CO_2-Durchleitung.
Der Luft sind etwa 5% CO_2 beigemischt.

sofort	Zuckermenge in mg			
	nach 5 St.		Verlust	
	a	b	a	b
92,17	53,52	54,5	38,64	37,67

Nr. 54. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°.
Je 20 ccm Blut a) Luftdurchleitung, b) Luft-CO_2-Durchleitung.
Der Luft sind etwa 3% CO_2 beigemischt.

sofort	Zuckermenge in mg			
	nach 5 St.		Verlust	
	a	b	a	b
100,87	78,23	70,0	22,64	30,87

Neben dem Einfluß der untersuchten Gase sollte weiterhin die Wirkung verschiedener Zusätze zu dem Blute auf die Glykolyse geprüft werden. Namentlich die Rolle der Phosphate war in dieser Richtung von Interesse, da W. Loeb in einer Mitteilung, die erschien, während unsere Untersuchungen noch im Gange waren, zeigen konnte, daß den Phosphaten eine spezifisch fördernde Wirkung auf die Glykolyse zukommt.[1]) Mit diesen Angaben übereinstimmend fanden wir auch in vielen Fällen eine mehr oder weniger bedeutende Zunahme der Glykolyse, wenn wir zu den Blutproben ein Phosphatgemisch von passender Zusammensetzung hinzugefügt hatten. In anderen Fällen, die unter denselben Bedingungen angestellt waren, konnte hingegen keinerlei Einfluß des Phosphatgemisches wahrgenommen werden. Worauf diese Unterschiede beruhen, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Da nach Untersuchungen von W. Loeb eine große Reihe der verschiedenartigsten Verbindungen die Phos-

[1]) W. Loeb, diese Zeitschr. 32, 43, 1911.

phatwirkung hemmen können, so ist möglicherweise die Anwesenheit von hemmenden Stoffen in diesen Blutproben im Vergleich zu den anderen mit deutlicher Beförderung der Glykolyse nach Phosphatzusatz der Grund der erwähnten Erscheinung.

Nr. 55. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 1 ccm Phosphatgemisch (1 prim. : 6 sekund.), c) 2 ccm prim. Phosphat. Die Phosphatlösungen sind in allen Versuchen $^n/_2$.

Zuckermenge in mg						
sofort	nach 6 St.			Verlust		
	a	b	c	a	b	c
100,47	74,36	32,51	67,89	26,10	67,95	32,58

Nr. 56. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 2 ccm Phosphatgemisch (1 prim. : 2 sekund.), c) + 2 ccm prim. Phosphat.

Zuckermenge in mg						
sofort	nach 6 St.			Verlust		
	a	b	c	a	b	c
82,25	50,71	37,20	44,03	31,53	45,04	38,21

Nr. 57. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 1 ccm Phosphatgemisch (1 prim. : 6 sekund.).

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 6 St.		Verlust	
	a	b	a	b
87,61	69,30	75,01	18,31	12,60

Nr. 58. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 2 ccm Phosphatgemisch (1 prim. : 6 sekund.).

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 6 St.		Verlust	
	a	b	a	b
116,33	86,32	78,30	30,01	38,03

Nr. 59. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 2 ccm Phosphatgemisch (1 prim. : 6 sekund.) + 2 ccm prim. Phosphat.

Zuckermenge in mg						
sofort	nach 6 St.			Verlust		
	a	b	c	a	b	c
91,50	78,58	63,28	78,63	12,92	28,22	12,86

Nr. 60. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 2 ccm Phosphatgemisch (1 prim. : 6 sekund.).

Zuckermenge in mg				
sofort	nach 6 St.		Verlust	
	a	b	a	b
91,30	76,39	75,32	14,91	15,98

Wie aus den Tabellen ersichtlich, ist die Förderung der Glykolyse durch die Phosphate deutlich ausgesprochen, während sie in einigen Fällen nicht konstatiert werden kann. Immerhin überwiegen die Fälle, in denen eine gewisse Beschleunigung der Glykolyse nachweisbar ist.*)

*) Vor einiger Zeit haben Michaelis und einer von uns (R.) den Nachweis erbracht, daß in reinen Zuckerlösungen bei einer Reaktion, die der des Blutes entspricht, oder die ein wenig nach der alkalischen Reaktion (bis ca. 10^{-9}) verschoben ist, bei 37° innerhalb der in Betracht kommenden Zeiten keine Glykolyse eintritt.[1]) Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die alkalische Reaktion als solche nicht die Glykolyse veranlassen kann. Auf die Stichhaltigkeit der Einwände, die W. Loeb[2]) gegen diesen Schluß macht, werden Michaelis und Rona in einer demnächst erscheinenden Mitteilung zurückkommen. Jetzt sei nur in einigen Versuchen beiläufig gezeigt, daß auch bei gründlichster Durchlüftung der betreffenden Zuckerlösungen und auch bei stundenlanger Durchleitung von reinem Sauerstoff durch die Lösung innerhalb der Versuchszeit keine Glykolyse eintritt. Eingehendere Untersuchungen in dieser Richtung werden später publiziert.

Versuch. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Reine Traubenzuckerlösung. I. 10 ccm Zuckerlösung + 30 ccm dest. Wasser + 10 ccm Phosphatgemisch (0,5 ccm $^1/_3$ n prim., 9,5 ccm $^1/_3$ n sekund. Phosphat). II. 10 ccm Zuckerlösung + 30 ccm destill. Wasser + 10 ccm Phosphatmischung (5,0 ccm prim., 5,0 ccm sekund. Phosphat). III. 2,5 ccm Zuckerlösung + 40 ccm dest. Wasser + 8 ccm Phosphatmischung (1 ccm prim., 7 ccm sekund. Phosphat). — Während der Dauer des Versuchs wird ein langsamer Strom von Luft durch die Proben geleitet.

Probe	Zuckergehalt in %	
	gleich	nach 6 St.
I	1,12	1,13
II	0,55	0,54
III	1,13	1,14

[1]) Diese Zeitschr. 23, 364, 1910.
[2]) Diese Zeitschr. 29, 317, 1910.

Für größere Versuche an Organpreßsäften war es von Interesse, den Einfluß der gebräuchlichsten Antiseptica, Toluol und Chloroform, auf die (bis jetzt an aseptischen Blutproben beobachtete) Glykolyse festzustellen. Es ist nun beachtenswert, daß der Zusatz von etwa 1% Toluol zu den Blutproben die Glykolyse fast vollständig hemmen kann.

Nr. 61. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. 20 ccm Blut, verschlossen im Brutschrank stehend
a) ohne Toluol, b) mit Toluol (zu 1%).

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 6 St.	
	a	b
68,43	40,68	66,46

Nr. 62. Dauer des Versuchs 10 Stunden. Temperatur 37°. 20 ccm Blut, im Brutschrank stehend.
a) ohne Zusatz, b) Toluol (zu 1%).

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 10 St.	
	a	b
68,34	32,67	I. 67,66 II. 69,00

Versuch. Dauer des Versuchs 6 Stunden. Temperatur 37°. Reine Traubenzuckerlösung. I. 10 ccm Zuckerlösung + 30 ccm dest. Wasser + 10 ccm Phosphatgemisch (5,0 ccm prim., 5,0 ccm sekund. Phosphat). II. 2,5 ccm Zuckerlösung + 38,5 ccm dest. Wasser + 10 ccm Phosphatgemisch (1,0 ccm prim., 9,0 ccm sekund. Phosphat). III. 2,5 ccm Zuckerlösung + 38,5 ccm dest. Wasser + 10 ccm Phosphatgemisch (1,0 ccm prim., 9,0 ccm sekund. Phosphat. IV. 2,5 ccm Zuckerlösung + 38,5 ccm dest. Wasser + 10 ccm Phosphatmischung (1,0 ccm prim., 9,0 ccm sekund. Phosphat). Während des Versuchs wird durch die Proben im langsamen Strom reines Sauerstoffgas geleitet. V. wie IV., VI. wie IV.

Probe	Zuckergehalt in %	
	gleich	nach 6 St.
I	0,53	0,53
II	0,42	0,40
III	0,75	0,76
IV	0,19	0,19
V	0,83	0,83
VI	0,89	0,89

Nr. 63. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. 20 ccm Blut mit Toluol (zu 1%) versetzt.

Zuckermenge in mg	
sofort	nach 5 St.
136,35	133,04

Auch Chloroform hemmt die Glykolyse in hohem Maße, wenn auch anscheinend nicht so stark wie Toluol.

Nr. 64. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 10 ccm mit Chloroform gesättigter Ringer-Lösung.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 5 St.	
	a	b
85,56	62,65	81,94

Nr. 65. Dauer des Versuchs 8 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) ohne Zusatz, b) + 0,2 ccm Chloroform.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 8 St.	
	a	b
106,42	57,81	I. 90,01 II. 90,19

Nr. 66. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut a) mit Luftdurchleitung, b) + 10 ccm mit Chloroform gesättigter Ringer-Lösung.

Zuckermenge in mg		
sofort	nach 5 St.	
	a	b
93,59	77,28	85,05

Nr. 67. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Temperatur 37°. Je 20 ccm Blut + 10 ccm einer Chloroform-Ringer-Emulsion.

Zuckermenge in mg	
sofort	nach 5 St.
51,35	52,00

In allen Versuchen kann also eine deutliche Hemmung der Glykolyse auch durch Chloroform konstatiert werden. Unsere Beobachtungen stehen demnach mit den Angaben von Seegen[1]), der keine Beeinflussung der Glykolyse durch Chloroform gefunden hat, nicht in Übereinstimmung.

Die ungünstige Wirkung selbst geringer Mengen von Antiseptica auf die Glykolyse, das Ausbleiben der Glykolyse schon bei schonend getrocknetem Blut in den bisher untersuchten Fällen lassen die Schwierigkeiten der Arbeit mit Organextrakten oder mit Organpulvern in grellem Lichte erscheinen. Es darf jedoch nicht vergessen werden, daß Glykolyse im Blute und Glykolyse in den Organen nicht identische Prozesse zu sein brauchen.

Zum Schlusse wollten wir noch in einigen orientierenden Versuchen sehen, wie lange nach der Blutentnahme eine Glykolyse im aseptisch aufbewahrten Blut noch nachweisbar ist. Zu diesem Zwecke versetzten wir das durch 1 bis 2tägiges Stehen im Brutschrank zuckerfrei gewordene Blut mit einer Menge Zucker, die dem Zuckergehalt entsprach, der in einer gleich nach der Blutentnahme untersuchten (ev. mit Zucker versetzten) Blutprobe gefunden wurde. 8 Stunden nach dem Zuckerzusatz wurde der Zuckerverlust in den Blutproben untersucht und so die Stärke der Glykolyse im frischen und im längere Zeit gestandenen Blut verglichen.

Nr. 68. 20 ccm Blut. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 8 St.	Verlust in %
Blut, frisch	101,95	62,77	38
„ nach 24 St.	106,0	69,52	34
„ „ 48 „	106,0	75,93	28

Nr. 69. 20 ccm Blut. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 8 St.	Verlust in %
Blut, frisch	106,42	57,82	45
„ nach 24 St.	106,0	78,13	26
„ „ 48 „	106,0	106,22	0

[1]) Seegen, Centralbl. f. Physiol. 5, Nr. 25/26, 1891.

Nr. 70. Je 20 ccm Blut. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 8 St.	Verlust in %
Blut, frisch	103,87	86,61	16
„ nach 24 St.	100,00	100,17	0

Nr. 71. Je 20 ccm Blut. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 8 St.	Verlust in %
Blut, frisch	28,38	0,00	100
„ nach 24 St.	25,0	0,00	100
„ „ 48 „	25,0	0,00	100

Nr. 72. Je 20 ccm Blut. Temperatur 37°.

	Zuckermenge in mg		
	sofort	nach 8 St.	Verlust in %
Blut, frisch	28,59	0,00	100
„ nach 24 St.	25,0	14,09	45
„ „ 48 „	25,0	21,87	8

Eine Schwächung der glykolytischen Kraft ist, wie aus den Versuchen mit größeren Zuckermengen ersichtlich ist, schon nach 1tägigem Stehen des Blutes zu konstatieren. In einem Versuch (Nr. 70) mit äußerst schwacher glykolytischer Wirkung ist diese bereits nach einem Tag auf 0 gesunken. Bei Zuckermengen, die dem normalen Zuckerwert des Blutes entsprechen (Nr. 71 und 72), sehen wir jedoch noch nach einem Tag einen so ausgiebigen Verlust an Zucker, daß die Schwächung der Glykolyse nicht, resp. nicht so deutlich zutage tritt.

Im wesentlichen geben die hier mitgeteilten Versuche Anhaltspunkte für die Ansicht, daß die Glykolyse im Blut hauptsächlich an die intakten Formelemente desselben geknüpft ist. Welcher Anteil dabei den einzelnen Formelementen zukommt[1]), wird der Gegenstand einer späteren Mitteilung sein. Gegen die summarische Auffassung, die Glykolyse wäre ein Oxydationsvorgang, spricht die sehr ausgesprochene Glykolyse in einer reinen Wasserstoffatmosphäre.

[1]) Vgl. hierzu Lépine und Boulud l. c.

Biochemische Untersuchungen über aromatische Quecksilberverbindungen.

Von

Walther Schrauth und Walter Schoeller.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 22. April 1911.)

Unter obigem Titel macht Ferdinand Blumenthal im vorletzten Heft dieser Zeitschrift (32, erstes Heft, 59ff., 1911) Mitteilung über die pharmakologische Wirkung des Natriumsalzes der Diaminodiphenylmercuridicarbonsäure (Quecksilberdi-p-amidobenzoesäure), ausgehend von der Überlegung, daß man analog den beim Atoxyl gemachten Erfahrungen von aromatischen Quecksilberverbindungen besondere Wirkungen erwarten dürfe. Bei seinen Untersuchungen verwendet er vergleichsweise auch das von uns synthetisch dargestellte Asurol, ohne indessen auch nur mit einem Wort unsere diesbezügliche, im Dezember 1909 in den Therapeutischen Monatsheften erschienene Arbeit „Zur Synthese des Asurol" und die dort publizierten Erwägungen zu berücksichtigen.

Da Herr Blumenthal weitere Untersuchungen in Aussicht stellt, so müssen wir darauf hinweisen, daß wir selbst seit etwa 4 Jahren auf dem gleichen Arbeitsgebiet tätig sind und, wie gesagt, im Jahre 1909 bereits zum erstenmal das Natriumsalz einer aromatischen Quecksilbercarbonsäure für therapeutische Zwecke empfohlen haben, indem wir den von Blumenthal wiedergegebenen Gedankengang in folgender Form zum Ausdruck brachten:

„Wenn sich die synthetische Chemie nunmehr die Aufgabe stellte, Verbindungen darzustellen, die die schwer in eins zu vereinbarenden, oben genannten Forderungen (d. h. schnelle und leichte Löslichkeit, Haltbarkeit der erhaltenen Lösungen, die ihrerseits Metallinstrumente nicht amalgamieren, Eiweiß nicht fällen und reizlos injizierbar sein sollen, Auslösung der bekannten Giftwirkungen des Queckailbers im Organismus, aber in gemilderter Form) erfüllen sollten, so konnte kein Zweifel bestehen, daß die für die Lösung des Problems geeigneten Sub-

stanzen nur im Bereich des nicht ionisierbaren Quecksilbers zu suchen waren, und daß hier wiederum die Quecksilber-Kohlenstoffbindung die größten Aussichten bot. Denn organische Reste, die das Metall gebunden enthalten, lassen sich durch Einführung mannigfaltiger Gruppen löslich machen, entgiften und überhaupt in der verschiedensten Weise modifizieren, so daß der Synthese hier die größte Möglichkeit gegeben ist, durch Veränderung des Moleküls etwaige Mängel zu beseitigen."

Anschließend führten wir sodann aus, daß die physiologisch günstigsten Bedingungen gegeben sind, „wenn das Quecksilber in der Phenylgruppe aromatischer Substanzen gebunden ist".

Wie wir derzeit gesagt haben, waren wir zu dieser Erkenntnis auch auf Grund ausführlicher pharmakologischer Untersuchungen gelangt, die Prof. Franz Müller gemeinsam mit uns unternommen hatte und deren Erscheinen wir damals im Dezember 1909 in Aussicht stellten.

Was nun die spezielle Untersuchung des Herrn Blumenthal anbetrifft, so möchten wir bemerken, daß Quecksilberdicarbonsäuren in der aliphatischen wie aromatischen Reihe seit langem und auch schon vor unseren oben zitierten Untersuchungen bekannt waren, und daß bereits E. Fischer und J. von Mering auf die Ungiftigkeit der β-Quecksilberdipropionsäure hingewiesen haben.[1]) Diese leider zu wenig beachtete Tatsache haben wir zu erklären versucht, indem wir in unserer oben zitierten Arbeit „Zur Synthese des Asurol" schrieben:

„Vom chemischen Standpunkt erklärt sich diese höchst beachtenswerte Tatsache wohl daraus, daß hier die beiden Valenzen des Quecksilbers durch die eingegangene Kohlenstoffbindung zu fest verankert liegen. Wahrscheinlich hat die leicht lösliche Substanz den Organismus eher passiert, als dieser fähig ist, das Metall herauszuspalten. Diese Vermutung gewinnt dadurch an Wahrscheinlichkeit, daß starke Quecksilberreagenzien wie Ammoniumsulfid das in der Verbindung gebundene Quecksilber selbst beim Kochen nicht in Sulfid überführen können."

In der Zwischenzeit ist nun Prof. Müller gemeinsam mit uns bestrebt gewesen, für diese Vorstellung einen experimentellen Beweis zu erbringen, der uns geglückt ist, indem wir die Ausscheidung der bereits von L. Pesci dargestellten Quecksilberdibenzoesäure[2]) nach subcutaner Injektion im Gegensatz

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 1, S. 388, 1907.

[2]) L. Pesci, o-Mercuridibenzoesäure. Atti R. Accad. dei Lincei Roma 10, I, S. 413; Chem. Centralbl. 2, 108, 1901.

zu Herrn Blumenthal quantitativ verfolgt und die Ausgangssubstanz in chemisch reiner Form aus dem Harn wiedergewonnen haben.

Es schien uns aber nur wenig verdienstlich, in einer Einzelmitteilung lediglich auf diese Tatsache hinzuweisen, wir haben vielmehr die Giftwirkung organischer Quecksilberverbindungen überhaupt zu ergründen versucht und werden in einem der nächsten Hefte dieser Zeitschrift die Ergebnisse dieser mehrjährigen Untersuchungen zusammenhängend publizieren.

Daß das von Herrn Blumenthal beschriebene Natriumsalz „im Reagensglase kein Antisepticum" ist, bestätigt im übrigen nur das Ergebnis unserer Untersuchungen „Über die Desinfektionskraft komplexer organischer Quecksilberverbindungen" vom August 1910.[1]) Wir schrieben nämlich damals, bezugnehmend auf die tabellarisch dargelegte Unwirksamkeit des quecksilberdibenzoesauren Natriums:

„Schließlich schwindet die Desinfektionskraft fast vollständig bei dem mit beiden Valenzen an den Benzolkern gebundenen Quecksilber, da die Kohlenstoffbindung des Quecksilbers die stabilste ist, die das Metall einzugehen vermag."

Zum Schluß möchten wir noch unserer Verwunderung Ausdruck geben darüber, daß nach Versuchen von Dr. Franz Blumenthal in der Lesserschen Klinik dem oben genannten Natriumsalz der Quecksilberdi-p-amidobenzoesäure „eine ausgesprochen spirillocide Wirkung im tierischen Orgaganismus zukommen" soll. Die Herren Prof. Schilling und Dr. von Krogh sind seit längerer Zeit gemeinsam mit uns mit systematischen Untersuchungen über die Wirkung organischer Quecksilberverbindungen an spirillös infizierten Tieren beschäftigt und konnten bisher eine Beeinflussung der Infektion durch dem obigen Präparat analoge Quecksilberdicarbonsäuren nicht konstatieren. Präparate von der Ungiftigkeit dieser Verbindungen sind in unseren Tierversuchen stets wirkungslos gewesen, ein Befund, der eine außerordentliche Stütze findet in der schon obenerwähnten Mitteilung E. Fischers und J. von Merings über die Unwirksamkeit der β-Quecksilberdipropionsäure bei menschlicher Lues.

[1]) Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten 66, 497 ff.

Bemerkung zu meiner Arbeit:

„Ein Beitrag zur chemischen Zusammensetzung der Placenta".[1])

Von

Shigeji Higuchi, Tokio.

(Eingegangen am 20. April 1911.)

In der Angabe der analytischen Resultate bedürfen einige mit Rechenfehlern behaftete Werte einer Korrektur, die in der folgenden Tabelle angegeben ist. Die Schlußfolgerungen meiner Untersuchungen werden durch die abgeänderten Daten nicht berührt.

		Männl. Placenta Mittelwerte		Weibl. Placenta Mittelwerte		Gesamtmittel	
		falscher Wert	korrigierter Wert	falscher Wert	korrigierter Wert	falscher Wert	korrigierter Wert
Prozent in der frischen Placenta	Wasser	86,28	86,27				
	Trockensubstanz					15,09	15,10
	Na	0,1167	0,1160			0,1323	0,1319
	Ca			0,0844	0,0848	0,0514	0,0516
	Fe			0,0117	0,0127	0,0120	0,0131
Prozent im Pulver	Na	0,6810	0,6814			0,7347	0,7329
	Mg			0,0459	0,0495	0,0456	0,0474
	Fe					0,0710	0,0735

[1]) Diese Zeitschr. 15, 103, 1909; 22, 343, 1909.

Autorenverzeichnis.

Aron, Hans und Felix Hocson. Reis als Nahrungsmittel. Untersuchungen über den N- und P_2O_5-Stoffwechsel bei Ernährung mit Reis und anderer hauptsächlich vegetabilischer Nahrung. S. 189.

Bang, Ivar. Untersuchungen über Diastasen. I. S. 417.

— Methodologische Notizen. S. 443.

Bauer, Heinrich. Untersuchungen üb. Oberflächenspannungsverhältnisse in der Milch und über die Natur der Hüllen der Milchfettkügelchen. S. 362.

Blumenthal, Ferdinand. Biochemische Untersuchungen über aromatische Quecksilberverbindungen. I. S. 59.

— und Emanuel Navassart. Über Atoxyl. V. S. 380.

Boulud siehe Lépine und Boulud.

Costantino, A. Beziehungen zwischen höheren Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen in verschiedenen Entwicklungsperioden des Organismus. I. S. 473.

Döblin, A. siehe Rona und Döblin.

Doxiades, Leonidas. Beobachtungen über die Maltase des Blutserums und der Leber. S. 410.

Friedenthal, H. siehe Lachs und Friedenthal.

Glagolew, P. Über die Regeneration von Eiweiß in der Magenschleimhaut. S. 222.

Grafe, Viktor. Die biochemische Seite d. Kohlensäure-Assimilation durch die grüne Pflanze. S. 114.

Harden, A. und W. J. Young. Über die Zusammensetzung der durch Hefepreßsaft gebildeten Hexosephosphorsäure. I. S. 173.

Higuchi, Shigeji. Bemerkung zu meiner Arbeit: „Ein Beitrag zur chemischen Zusammensetzung der Placenta". S. 512.

Hocson, Felix siehe Aron und Hocson.

Iwanoff, Nicolaus. Die Wirkung der nützlichen und schädlichen Stimulatoren auf die Atmung der lebenden u. abgetöteten Pflanzen. S. 74.

Jolles, Adolf. Einwirkung von Ammoniak und von Natriumcarbonat auf verschiedene Zuckerarten in verdünnter wässeriger Lösung. S. 97.

Kakiuchi, Samuro. Ein Beitrag zur Fettbestimmung im pathologischen Harne. S. 137.

Karaúlow, Theodor. Über Entgiftung glucosidischer Harngifte durch Cholesterin in Versuchen am ausgeschnitt. Froschherzen. S. 145.

v. Kereszty, Georg siehe Tangl und Kereszty.

Kochmann, Martin und Ernst Petzsch. Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde nebst Bemerkungen über den Stoffwechsel der Phosphorsäure und der Magnesia. II. S. 10.

— — — Desgl. III. S. 27.

Lachs, Hilary und H. Friedenthal. Die Bestimmung des Eisens auf colorimetrischem Wege. S. 130.

Lépine, R. und Boulud. Über den Zucker des Plasmas und der Blutkörperchen. S. 287.

Loeb, Jacques (unter Mitwirkung von Hardolph Wasteneys). Über d. Entgiftg. von Kaliumsalzen durch die Salze von Calcium und anderen Erdalkalimetallen. S. 306.

Loeb, Jacques (unter Mitwirkung von Hardolph Wasteneys). Die Erhöhung der Giftwirkung von KCl durch niedrige Konzentrationen von NaCl. S. 155.

Löb, Walther. Beiträge zur Frage der Glykolyse. II. S. 43.

Mancini, Stefano. Über den Restkohlenstoff des menschlichen Blutes unter normalen und pathologischen Verhältnissen. S. 164.

Marchlewski, L. Über die Dualität der Chlorophyllane. S. 332.

— und J. Robel. Studien in der Chlorophyllgruppe. IX. S. 204.

Mayer, Paul. Über Zerstörung von Traubenzucker durch Licht. S. 1.

Meyer, Kurt. Zur Kenntnis der Bakterienproteasen. S. 274.

— Über Anti-Bakterienproteasen. S. 280.

Navassart, Emanuel siehe Blumenthal und Navassart.

Neubauer, E. und O. Porges. Über Nebenniereninsuffizienz bei Phosphorvergiftung. S. 290.

Neuberg, C. und L. Tir. Über zuckerfreie Hefegärungen. II. S. 323.

Petzsch, Ernst siehe Kochmann und Petzsch.

Porges, O. siehe Neubauer und Porges.

Preti, L. Die Muskelarbeit und deren ketogene Wirkung. S. 231.

Robel, J. siehe Marchlewski und Robel.

Rona, P. Über Esterspaltung in den Geweben. S. 482.

Rona, P. und A. Döblin. Beiträge zur Frage der Glykolyse. II. S. 489.

Rullmann, W. Die Schardinger-Reaktion der Milch. S. 446.

Salkowski, E. Kleinere Mitteilungen. S. 335.

Scaffidi, Vittorio. Untersuchgn. über den Purinstoffwechsel. VI. S. 101.

Schoeller, Walter siehe Schrauth und Schoeller.

Schrauth, Walther und Walter Schoeller. Biochemische Untersuchgn. über aromatische Quecksilberverbindungen. S. 509.

Sieber, N. Über die Beziehung der Infektion zu Enzymen. S. 108.

Starkenstein, Emil. Das Verhalten der Uransalze zweibasischer Phosphorsäuren geg. Indicatoren. S. 235.

— Ionenwirkung der Phosphorsäuren. S. 243.

Tangl, Franz und Georg v. Kereszty. Zur Methodik der Bestimmung des Kohlenstoffs organischer Substanzen auf nassem Wege. S. 266.

Tir, L. siehe Neuberg und Tir.

Voorhoeve, N. Beiträge zum Kalkstoffwechsel. II. S. 394.

Wasteneys, Hardolph siehe Jacques Loeb.

Wohlgemuth, J. Bemerkungen zu der Arbeit von B. Slowtzoff: Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern. S. 172.

Young, W. J. Über die Zusammensetzung der durch Hefepreßsaft gebildeten Hexosephosphorsäure. II. S. 177.

— siehe Harden und Young.

CHEMISTRY LIBRARY

CHEMISTRY LIBRARY

JOURNAL
Does Not Circulate

ALF Collections Vault
3 0000 091 476 907